

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. Februar 2001 (15.02.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/11370 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/58, 33/533, C09B 23/14, 23/01

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/07070

(22) Internationales Anmeldedatum:
24. Juli 2000 (24.07.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 37 024.9 5. August 1999 (05.08.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-51368 Leverkusen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DEROOVER, Geert [BE/BE]; Ogezlaan 26, B-2500 Lier (BE). MISSFELDT, Michael [DE/DE]; Schnugsheide 27, D-42799 Leichlingen (DE). SIMON, Lydia [DE/DE]; Zeisigweg 10, D-42489 Wülfrath (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT; D-51368 Leverkusen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

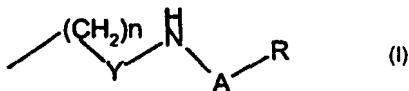
Veröffentlicht:

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: USE OF ACYLSULFONAMIDO-SUBSTITUTED POLYMETHINE DYES AS FLUORESCENCE DYES AND/OR MARKERS

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON ACYLSULFONAMIDO SUBSTITUIERTEN POLYMETHIN-FARBSTOFFEN ALS FLUORESCENZ-FARBSTOFFE UND/ODER MARKER



(57) Abstract: The invention relates to novel polymethine dyes that contain at least one acylsulfonamido group according to formula (I) wherein n, Y, A and R have the meaning indicated in the claims, and at least one compound according to formulae (a) to (n) indicated in the claims. The inventive polymethine dyes are useful as dyes and/or markers, especially for staining or marking biomolecules.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft neue Polymethinfarbstoffe enthaltend mindestens eine Acylsulfonamidogruppe gemäß Formel (I), worin n, Y, A und R die in den Ansprüchen angegebene Bedeutung haben, sowie mindestens eine Verbindung der in den Ansprüchen angegebenen Formeln (a) bis (n). Die erfindungsgemäßen Polymethinfarbstoffe eignen sich zur Verwendung als Farbstoffe und/oder Marker, insbesondere zum Anfärben oder Markieren von Biomolekülen.

WO 01/11370 A1

**Verwendung von Acylsulfonamido substituierten Polymethin-Farbstoffen als
Fluoreszenz-Farbstoffe und/ oder Marker**

5 In den letzten Jahren wurden immer empfindlichere und einfacher zu handhabende
Detektionsmethoden entwickelt, die besonders in der Biotechnologie, wo geringe
Substanzmengen für eine Analyse zur Verfügung stehen, eingesetzt werden. Hier
finden beispielsweise fluoreszente Detektionsmethoden immer weitere Verbreitung.
Die Fluoreszenzfarbstoffe werden als Label benutzt, um biologische Substanzen, wie
10 Proteine, DNA, RNA, Kohlenhydrate, Fette oder ganze Zellen zu markieren. Da je-
doch viele der zu markierenden Substanzen selbst fluoreszente Eigenschaften im Be-
reich um 400 bis 500 nm aufweisen sollten die zur Markierung einzusetzenden Farb-
stoffe bei Wellenlängen oberhalb 500 nm, üblicherweise im Bereich zwischen 500
und 1200 nm, absorbieren. In diesem Wellenlängenbereich sind außerdem preiswerte
15 Laser Dioden als Lichtquellen verfügbar.

Die aus dem Stand der Technik bekannten Fluoreszenzfarbstoffe sind häufig mit
hydrophilen oder aciden Gruppen substituiert, um die Wasserlöslichkeit bei neu-
tralem oder leicht basischem pH zu gewährleisten. Dies erleichtert die Markierung
20 von biologischem Material, das überwiegend im wässrigen Medium funktionsfähig
ist. Die Farbstoffe sollten außerdem photostabil sein, um auch Messmethoden, die
eine längere Bestrahlung beinhalten, zu ermöglichen. Viele der längerwelligen Farb-
stoffe weisen jedoch keine ausreichende Photostabilität auf.

25 Die Farbstoffe werden kovalent oder auch adsorptiv an die biologischen Proben ge-
bunden. Proteine, z.B. weisen mit der Sulfhydrylgruppe und freien Aminogruppen
reaktive Reste auf, an die ein Farbstoffmolekül kovalent gekoppelt werden kann. Des
weiteren können sich hydrophile oder lipophile Farbstoffe adsorptiv an die hydro-
philen und hydrophoben Domänen der Proteine anlagern. Ebenso können über
30 ionische Wechselwirkungen Adsorptionen von ionischen Farbstoffen an Proteine
stattfinden.

Die bisher häufig in Bioassays eingesetzten Cyaninfarbstoffe (Waggoner et al. Bioconjugate Chemistry, 4,105-111,(1993), US 5,268,486, WO 97/13810) haben die Eigenschaft zu aggregieren. Es können sich neben dem Monomer noch H-Aggregate und J-Aggregate ausbilden, je nach chemischer Umgebung, (z.B. pH-Wert) des Farbstoffes. Dies wird in der Photographie ausgenutzt, da die Absorptionen der Aggregate hypsochrom bzw. bathochrom gegenüber der Monomerabsorption verschoben sind. Dieser Aggregationseffekt ist für das Biolabeling jedoch unerwünscht, weil er auch hier zu einer oder mehreren zusätzlichen Absorptionsbanden führt.

10

Häufig werden Multiplexassays durchgeführt, bei denen mit verschiedenen Farbstoffen markierte Proben bei verschiedenen Wellenlängen angeregt werden. Um eine ausreichende Trennung der Anregungs- und Emissionssignale zu erhalten, dürfen die Absorptionen der Farbstoffkonjugate nicht überlappen. Hier ist eine scharfe, reproduzierbare und von pH-Wert oder Lösungsmiteleinflüssen unabhängige Absorption der Farbstoffe wichtig. Die Aggregationsneigung der häufig verwendeten Cyaninfarbstoffe verringert außerdem die Intensität der Fluoreszenz durch Quenching. Die emittierte Strahlung wird entweder direkt wieder reabsorbiert oder es kommt zu strahlungslosen Verlustprozessen der Energie.

20

Die aus dem Stand der Technik bekannten Farbstoffe zum Biolabeln, die Cyaninfarbstoffe stellen eine Klasse der Polymethine dar. Daneben sind aus der WO 97/40104 beispielsweise Quadratsäurederivate als Farbstoffe für das Biolabeling bekannt.

25

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, neue Fluoreszenzfarbstoffe als Fluoreszenzlabel oder Färbungsfarbstoffe mit verbesserten Eigenschaften gegenüber den aus dem Stand der Technik bekannten Cyaninfarbstoffen zur Verfügung zu stellen. Insbesondere sollte die Löslichkeit in biologischen Puffersystemen sowie die Photostabilität verbessert werden und besonders die Aggregationsneigung verringert werden. Gleichzeitig sollten die erfindungsgemäßen Verbindungen sich jedoch auch

30

- 3 -

durch eine höhere Quantenausbeute sowie einen höheren Extinktionskoeffizienten auszeichnen.

- 5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Polymethinfarbstoffe enthaltend mindestens eine Acylsulfonamidogruppe gemäß Formel (I)



worin

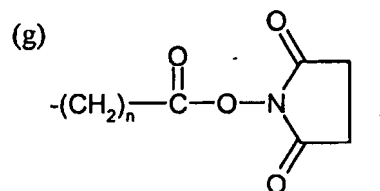
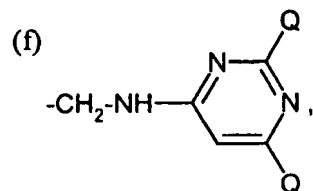
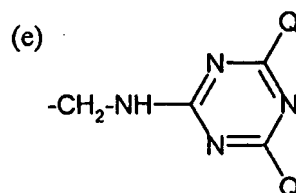
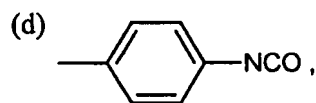
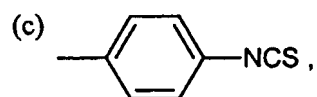
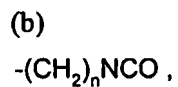
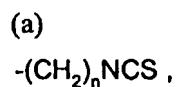
- 10 n für 1,2,3, 4, 5, 6, 7, 8 oder 9

Y , A für elektronenziehende Reste, vorzugsweise $\text{C}=\text{O}$ oder $-\text{SO}_2-$, und

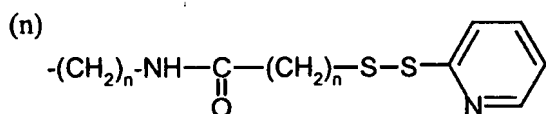
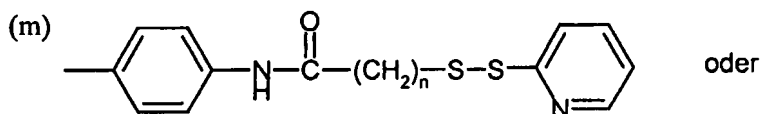
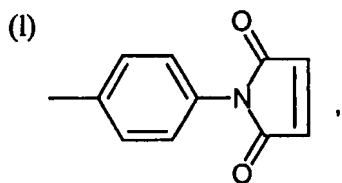
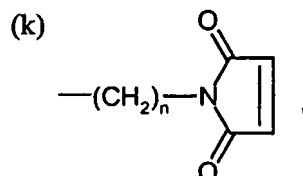
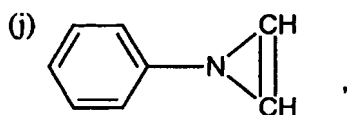
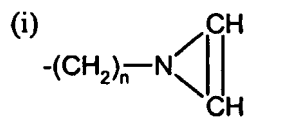
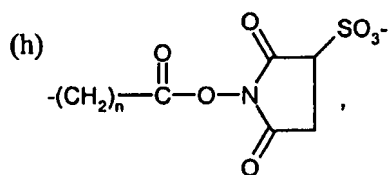
R für einen gegebenenfalls substituierten Alkyl- oder Arylrest

15

stehen und enthaltend mindestens eine Verbindung der folgenden Formeln:

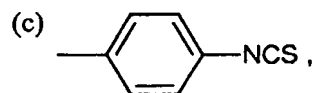
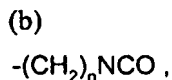
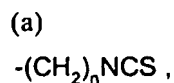


- 4 -

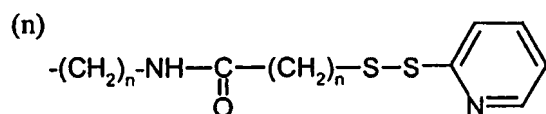
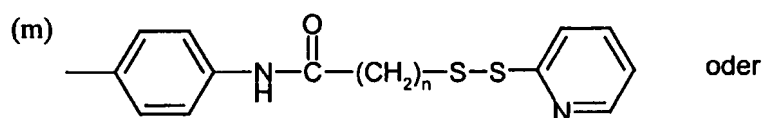
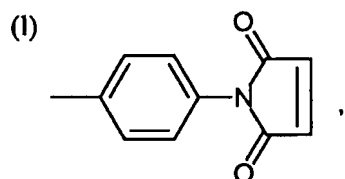
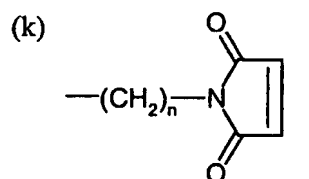
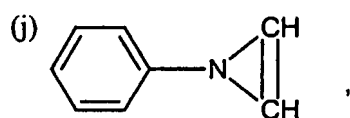
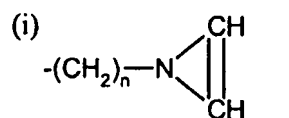
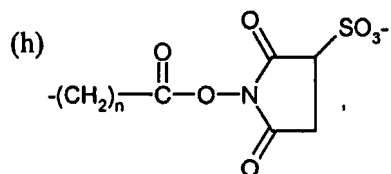
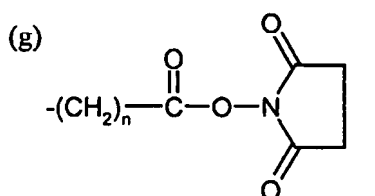
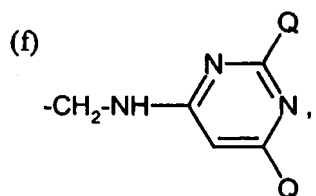
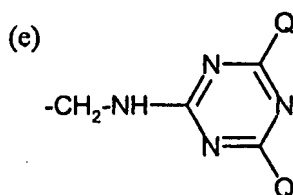
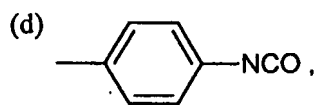


Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von Polymethinfarbstoffen enthaltend mindestens eine Acylsulfonamidogruppe gemäß Formel (I) zum Anfärben und/ oder Biolabeln von Biomolekülen.

- 5 Erfindungsgemäße Polymethinfarbstoffe, die nicht nur zum Anfärben sondern zum Biolabeln durch Ausbildung einer kovalenten Bindung verwendet werden sollen, weisen neben einer Gruppe der Formel (I) zusätzlich mindestens eine Gruppe auf, die in der Lage ist eine solche kovalente Bindung auszubilden, derartige Gruppen sind erfindungsgemäß vorzugsweise

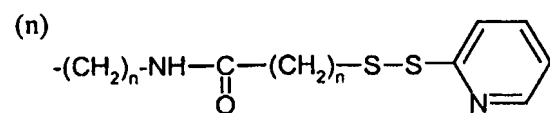
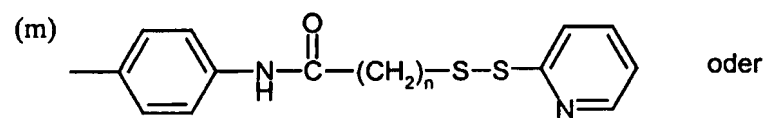
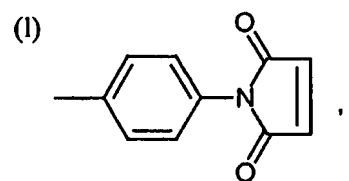
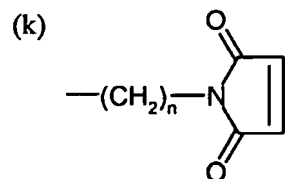
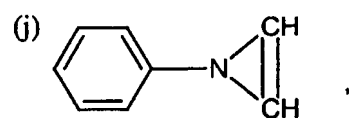
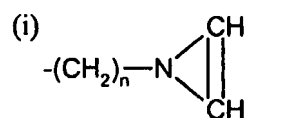
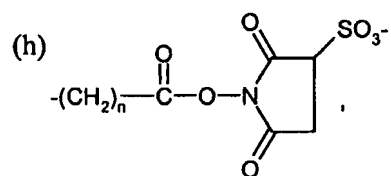
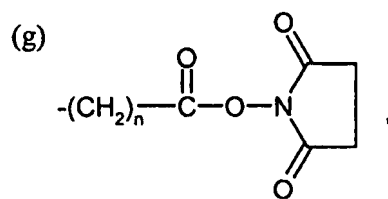
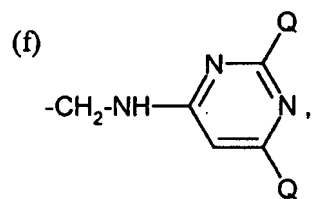
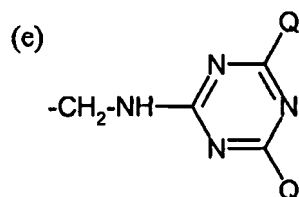
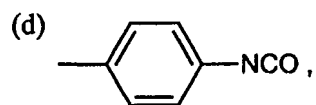
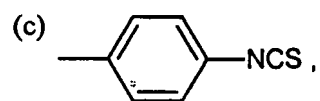
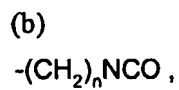
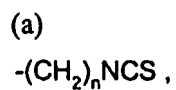


- 5 -



Daher betrifft ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung die Verwendung von Polymethinfarbstoffen enthaltend mindestens eine Acylsulfonamidogruppe gemäß Formel (I) und mindestens eine zur kovalenten Bindung befähigte Gruppierung ausgewählt aus der Liste der folgenden Verbindungen:

- 6 -



zum Markieren von Biomolekülen durch kovalente Bindung.

Unter **Biomolekülen** sind im Sinne der folgenden Anmeldung Proteine sowie DNA und/ oder RNA zu verstehen. Außerdem können im Sinne der vorliegenden Anmeldung auch Zellen als Biomoleküle angesehen werden. Ebenso sind darunter auch
5 kleine organische Moleküle mit biologischer Wirkung zu verstehen.

Polymethinfarbstoffe, die neben einer Verbindung der Formel (I) zusätzlich eine Gruppe ausgewählt aus einer der Formeln (a) bis (n) aufweisen sind aus dem Stand der Technik noch nicht bekannt und stellen neue Verbindungen dar. Diese eignen
10 sich insbesondere zum Biolabeln, da sie befähigt sind kovalente Bindungen auszubilden.

Unter einer **elektronenziehenden Gruppe** im Sinne der vorliegenden Anmeldung sind sofern nicht anders beschrieben bevorzugt Gruppen zu verstehen, wie sie in
15 March, Advanced Organic Chemistry, 3rd Ed., S.17 und S. 238 beschrieben sind.

Unter **Alkyl** im Sinne der vorliegenden Anmeldung sind sofern nicht anders definiert lineare oder verzweigte, cyclische oder geradkettige, substituierte oder nicht substituierte Kohlenwasserstoffe zu verstehen. Insbesondere handelt es sich dabei um
20 Alkylgruppen mit 1 bis 12 C-Atomen, wie beispielsweise Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Isopropyl-, Butyl-, t-Butyl-, Neopentyl- und 2-Ethylhexylgruppen. Diese können jedoch weiter substituiert sein, besonders bevorzugt mit einer Carboxycarbonylgruppe.

Unter **Aryl** im Sinne der vorliegenden Anmeldung sind sofern nicht anders definiert aromatische Kohlenwasserstoffgruppen zu verstehen, wobei es sich vorzugsweise um
25 5- oder 6-gliedrige Ringsysteme handelt, welche monocyclisch aber auch als kondensierte Ringsysteme vorliegen können. Es kann sich dabei sowohl um substituierte als auch um nicht substituierte Ringsysteme handeln. Besonders bevorzugt sind beispielsweise Phenyl- und Naphthylgruppen.

Es wurde überraschenderweise gefunden, dass bei Verwendung der erfindungsgemäßen Farbstoffe in biologischen Systemen, wie z.B. in Proteinkonjugaten oder in biologischen Puffermedien, die Aggregationsneigung der Polymethine im Vergleich zu Cyaninen oder Quadratsäurefarbstoffen mit Alkylsulfonaten oder Alkylcarboxylaten wie sie in Patenten US 5,268,486, WO 96/00902, WO 97/13810 und WO 97/40104 beschrieben sind, deutlich reduziert werden konnte.

Ein weiterer Vorteil der erfindungsgemäß zu verwendenden Farbstoffe liegt darin, dass durch den Substituenten die chromogenen Eigenschaften der Polymethine nicht verändert werden. Bisher wurden z.B. die Funktionalität für eine verbesserte Löslichkeit der Cyaninfarbstoffe durch Einführen von Sulfogruppen in das am Chromophor beteiligte Arylsystem realisiert. Dies hat auch eine Verschiebung der spektralen Eigenschaften zur Folge, da die Substituenten elektronenziehende Wirkungen hatten. Die spektralen Eigenschaften von unsubstituierten Arylcyaninen sind beschrieben und so kann man durch die Einführung des Acylsulfonsäurerestes das Farbstoffsystem für den Einsatz in z.B. einem Bioassay direkt übertragen. Dies erspart langwierige Optimierungs- und Screeningarbeit.

Weiterhin weisen die Farbstoffe mit Acylsulfonamidogruppen einen hohen Extinktionskoeffizienten im Vergleich zu Alkylcarboxylaten auf. Dies führt zu einem weiteren Vorteil in der Anwendung als Label:

Bindet man die Farbstoffe kovalent als Label an z.B. ein Protein oder einen Antikörper, dann wird das Konjugat durch das molare Farbstoff/Proteingehaltsverhältnis charakterisiert. Um ein ausreichendes Signal zu erhalten, muss eine bestimmte Menge Farbstoff an das Protein gebunden sein. Je höher der Extinktionskoeffizient des Farbstoffs ist und damit seine Intensität, um so sensitiver ist der Farbstoff als Fluoreszenzlabel, da die Fluoreszenzintensität bei Absorptionen <0.05 vom Extinktionskoeffizient abhängig ist.

30

$$F = \phi K I_0 \epsilon c d$$

- 9 -

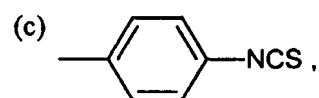
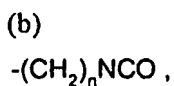
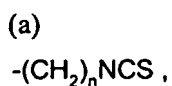
 Φ = Quantenausbeute I_0 = Intensität des eingestrahlten Lichtes ϵ = Extinktionskoeffizient5 c = Konzentration der Probe d = Schichtdicke

Da sich die Farbstoffe jedoch bei räumlicher Nähe quenchen, sollte das Farbstoff/Proteinverhältnis nicht zu groß werden. Dies hat einen Verlust der Fluoreszenzintensität zufolge. Daher sind Farbstoffe mit hohen Extinktionskoeffizienten besonders geeignet als Fluoreszenzlabel. Bereits geringe Farbstoffmengen ergeben ein intensives Fluoreszenzsignal bei einem geringen molaren Farbstoff/Proteingehalts-Verhältnis. Quenchprozesse werden also minimiert.

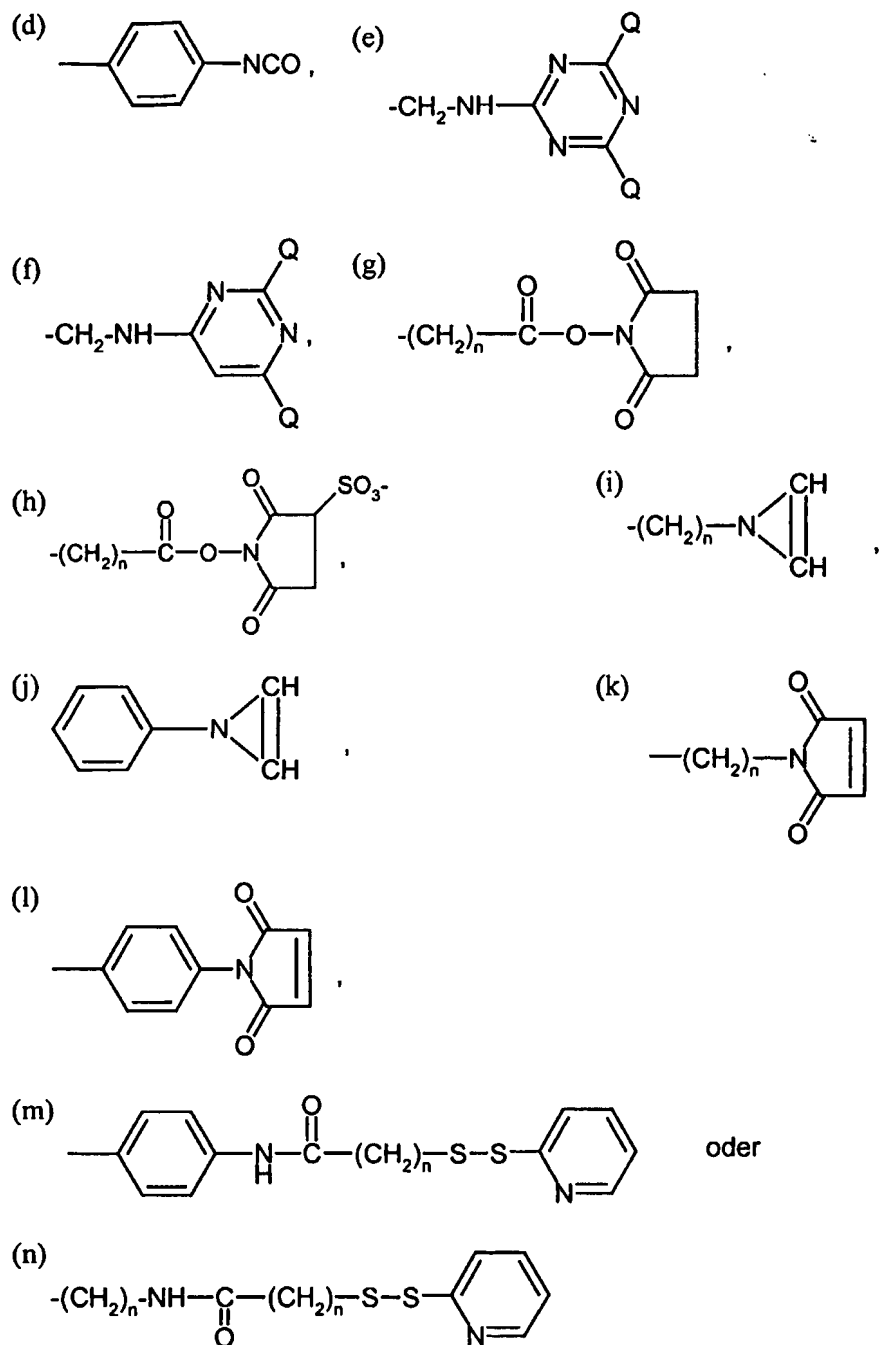
15 Als erfindungsgemäß einzusetzende Polymethinfarbstoffe eignen sich insbesondere Cyaninfarbstoffe, Merocyanine, Rhodacyanine, Styrolfarbstoffe, Quadratsäurefarbstoffe und der Crotonsäurefarbstoffe, wie sie im folgenden in bevorzugten Ausführungsformen näher beschrieben sind, welche sich alle dadurch auszeichnen, dass sie zur erfindungsgemäßen Verwendung mindestens einen Substituenten gemäß der

20 Formel (I) aufweisen. In einer weiteren Ausführungsform können auch die Polymethinfarbstoffe der Formeln (1) bis (5) aneinander gebunden sein, dabei können sowohl zwei oder mehr gleiche als auch verschiedene Farbstoffe aneinander gebunden sein. Erfindungsgemäße Polymethinfarbstoffe sind vorzugsweise solche der im folgenden aufgeführten Formeln welche neben einem Substituenten der Formel (I)

25 zusätzlich mindestens einen Substituenten ausgewählt aus der Gruppe der folgenden Verbindungen enthalten:

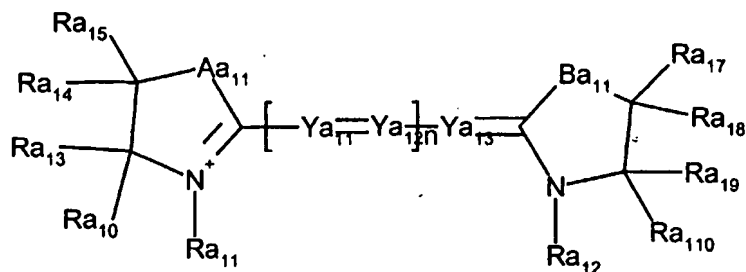


- 10 -

**1. Cyaninfarbstoffe:**

Als Cyaninfarbstoffe kommen erfindungsgemäß insbesondere solche der Formeln 1a, 1b und/ oder 1c in Frage

- 11 -



Formel 1-a

in der

5

Ra₁₀ bis Ra₁₁₀ unabhängig voneinander für einen beliebigen Substituenten stehen können,

n für 0,1,2,3 oder 4 steht,

10

Ya₁₁, Ya₁₂ und Ya₁₃ unabhängig voneinander für substituiertes oder unsubstituiertes C oder N stehen können wobei die Substituenten auch einen 5- oder 6-gliedrigen, aliphatischen oder aromatischen Carbo- oder Heterocyclus bilden können,

15

und

Aa₁₁ und Ba₁₁ unabhängig voneinander für O, S, Se, Te, N-Ra₁₁₁, C(Ra₁₁₂)(Ra₁₁₃) oder -C(Ra₁₁₄)=C(Ra₁₁₅)-, wobei Ra₁₁ bis Ra₁₁₅ unabhängig voneinander für H, gegebenenfalls substituiertes Alkyl, gegebenenfalls substituiertes Aryl oder gegebenenfalls substituiertes Alkenyl mit bis zu 20 C-Atomen stehen können,

20

mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Substituenten Ra₁₀ bis Ra₁₁₅ ausgewählt ist aus der Gruppe, die gebildet wird durch -(CH₂)₁-SO₂-Z-SO₂-R, -(CH₂)₁-CO-Z-SO₂-R, -(CH₂)₁-SO₂-Z-CO-R, und -(CH₂)₁-N(R)-SO₃⁻,

25

- 12 -

wobei

l für eine Zahl zwischen 1 und 6,

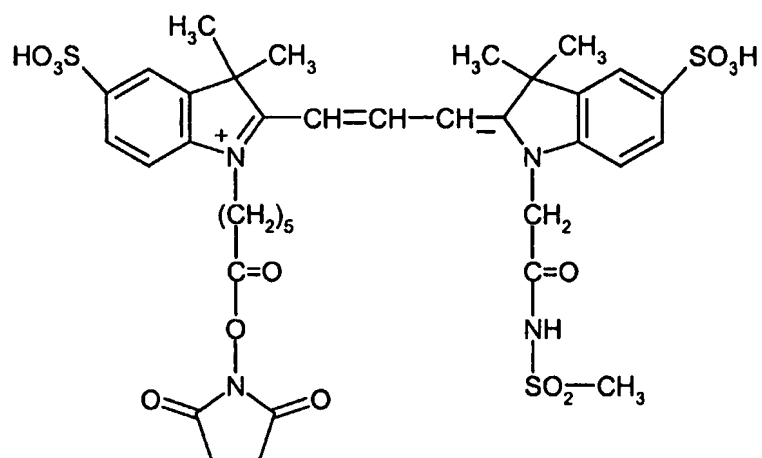
5 Z für NH oder N⁺ steht und

R bevorzugt für gegebenenfalls substituiertes Alkyl oder Aryl steht.

Besonders bevorzugte erfindungsgemäß einzusetzende Verbindungen der Formel 1a
10 sind im folgenden aufgeführt

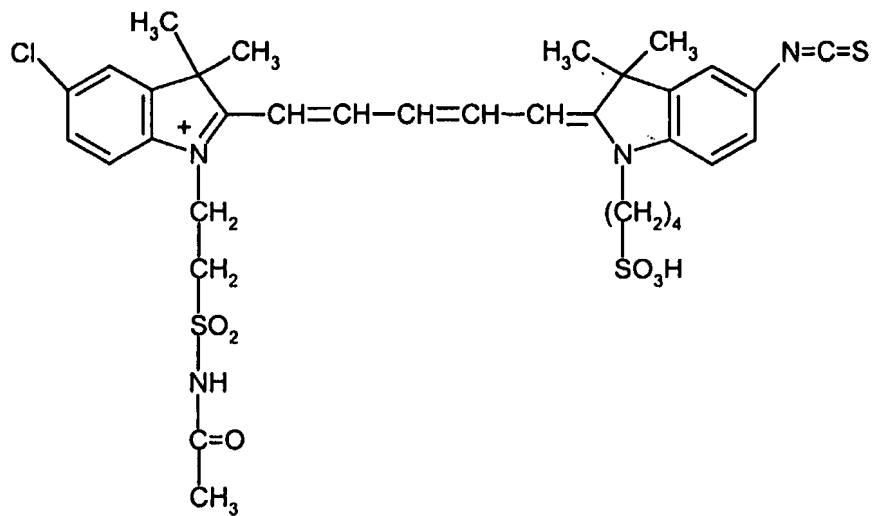
Bevorzugte Verbindungen der Formel 1a

I-a1

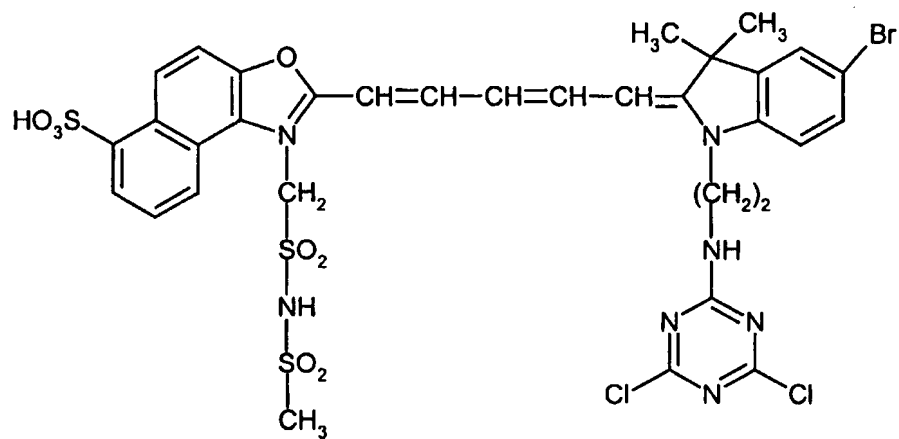


- 13 -

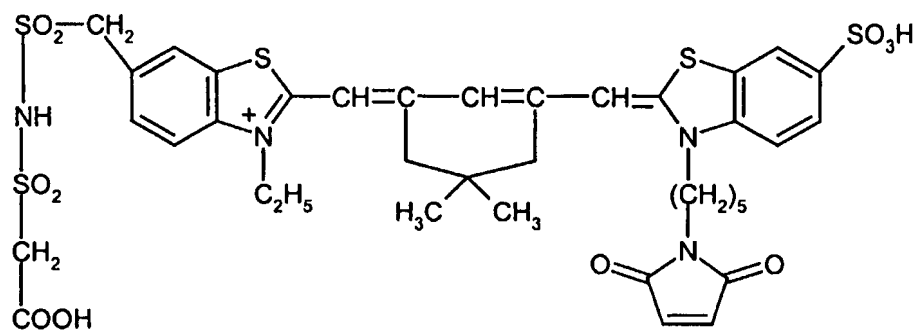
I-a2



I-a3



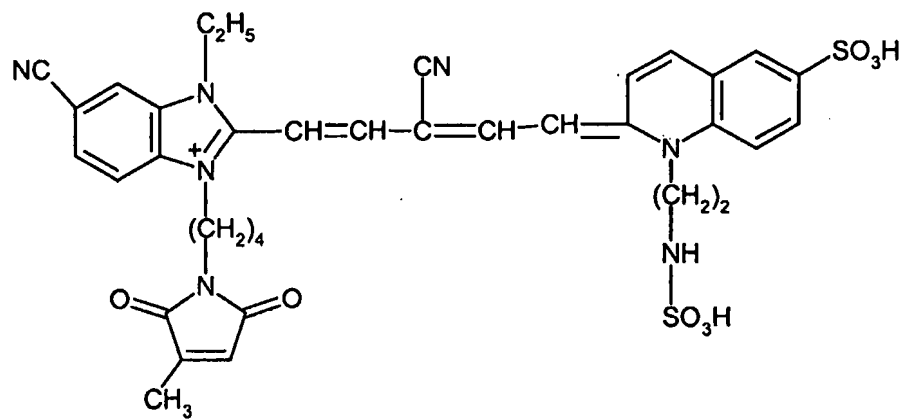
I-a4



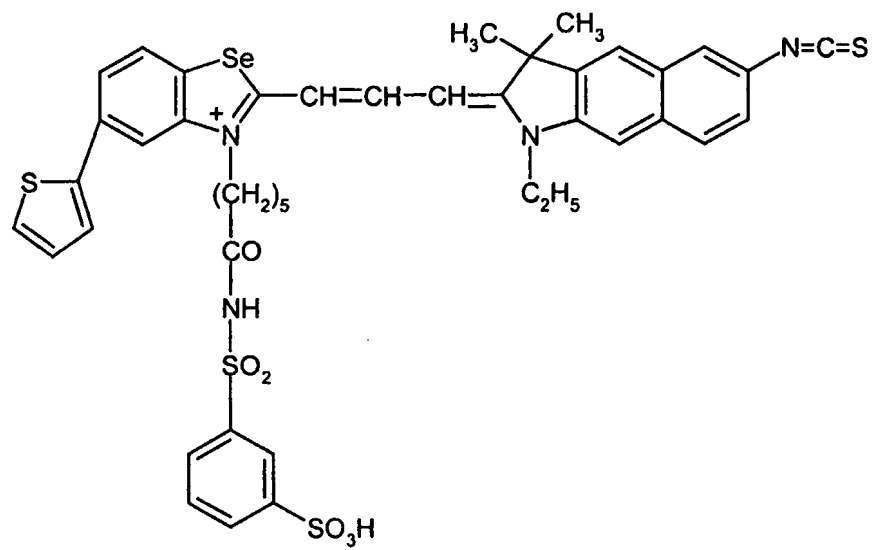
- 14 -

I-a5

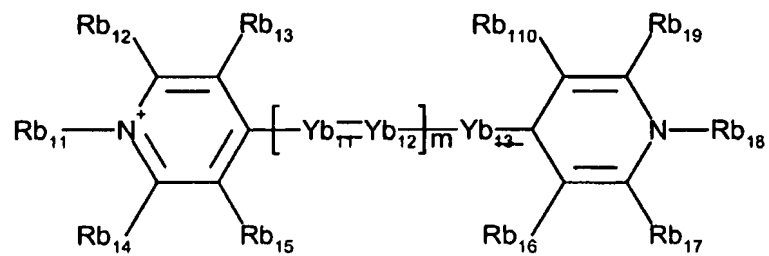
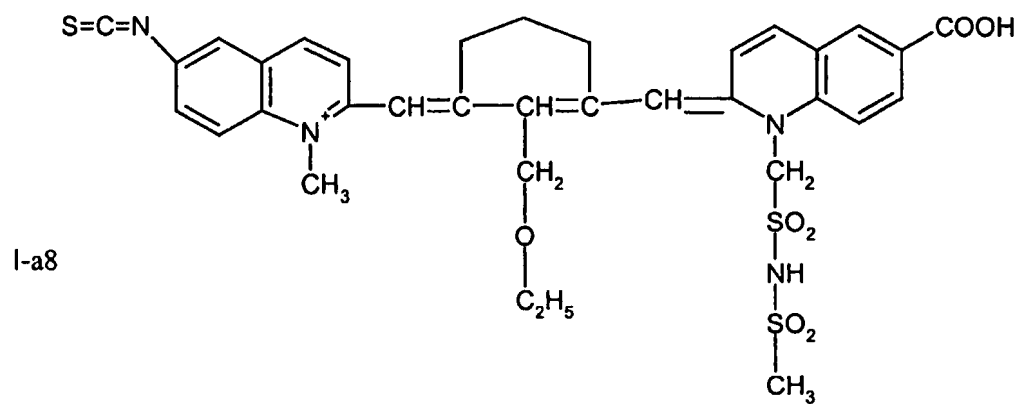
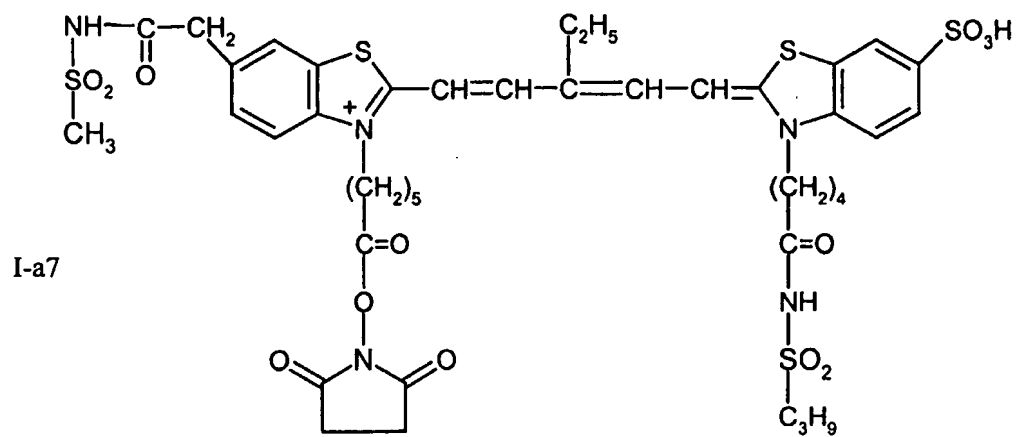
I



I-a6



- 15 -



Formel 1-b

in der

Rb₁₀ bis Rb₁₁₀ unabhängig voneinander für einen beliebigen Substituenten stehen können,

5

m für 0,1,2,3 oder 4 steht und

Yb₁₁, Yb₁₂ und Yb₁₃ unabhängig voneinander für substituiertes oder unsubstituiertes C oder N stehen können wobei die Substituenten auch einen 5- oder 6-gliedrigen, aliphatischen oder aromatischen Carbo- oder Heterocyclus bilden können,

10

mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Substituenten Rb₁₁ bis Rb₁₁₀ ausgewählt ist aus der Gruppe, die gebildet wird durch -(CH₂)_l-SO₂-Z-SO₂-R, -(CH₂)_l-CO-Z-SO₂-R, -(CH₂)_l-SO₂-Z-CO-R, und -(CH₂)_l-N(R)-SO₃⁻,

15

wobei

l für eine Zahl zwischen 1 und 6,

20

Z für NH oder N⁻ steht und

R bevorzugt für gegebenenfalls substituiertes Alkyl oder Aryl steht.

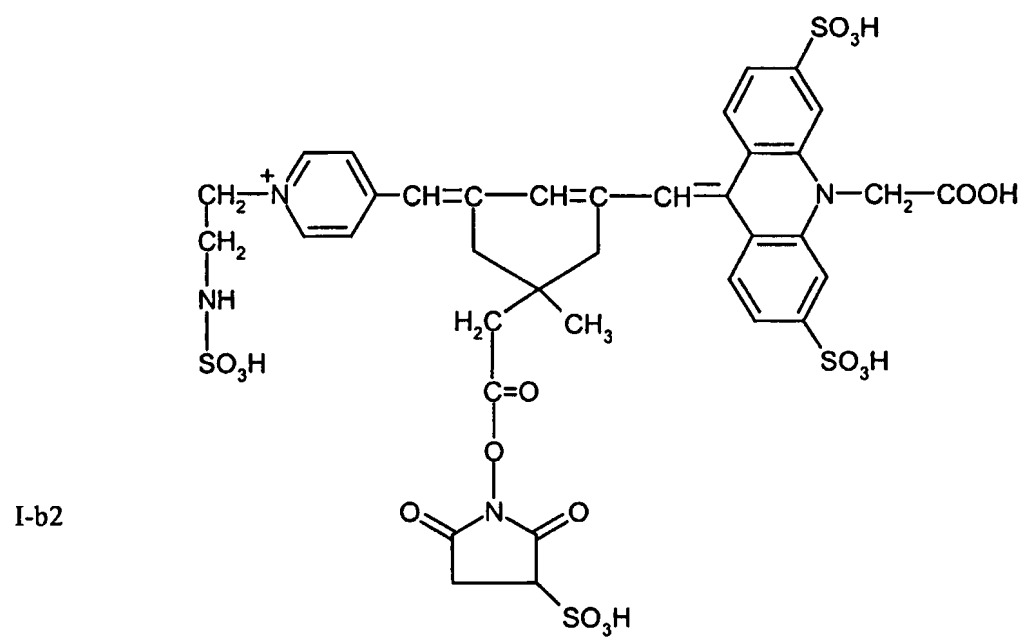
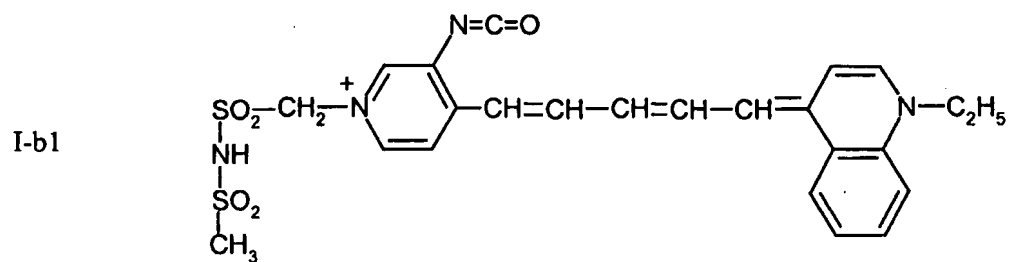
25 In einer bevorzugten Ausführungsform bilden folgende Substituenten einen 5- oder 6gliedrigen Carbo- oder Heterocyclus, der gegebenenfalls auch annelliert ist:

Der Substituent Rb₁₁ zusammen mit Rb₁₂ und/oder Rb₁₄, der Substituent Rb₁₂ zusammen mit Rb₁₃ und/oder Rb₁₁, der Substituent Rb₁₄ zusammen mit Rb₁₅ und/oder Rb₁₁, der Substituent Rb₁₈ zusammen mit Rb₁₉ und/oder Rb₁₇, der Substituent Rb₁₇

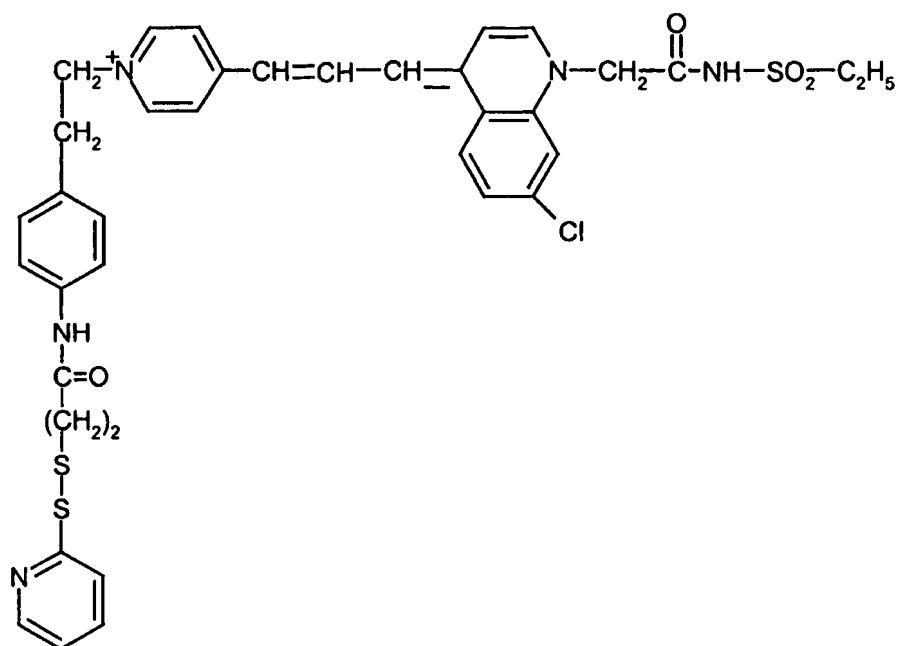
30

zusammen mit Rb₁₆ und/oder Rb₁₈, der Substituent Rb₁₉ zusammen mit Rb₁₁₀ und/oder Rb₁₈.

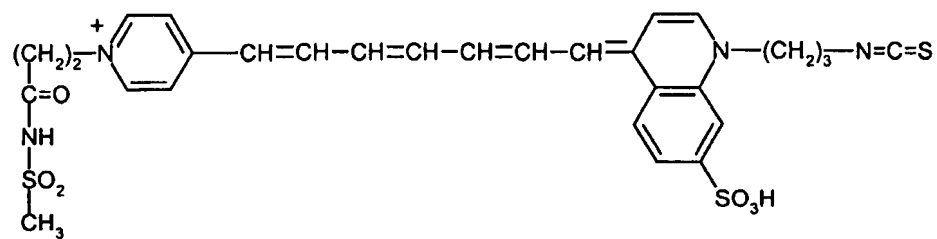
Besonders bevorzugte Verbindungen der Formel 1b:



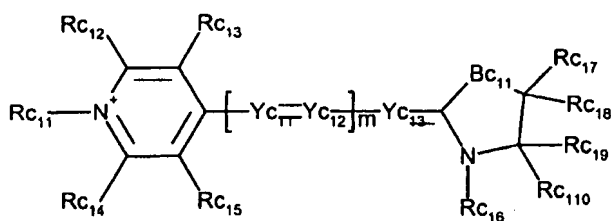
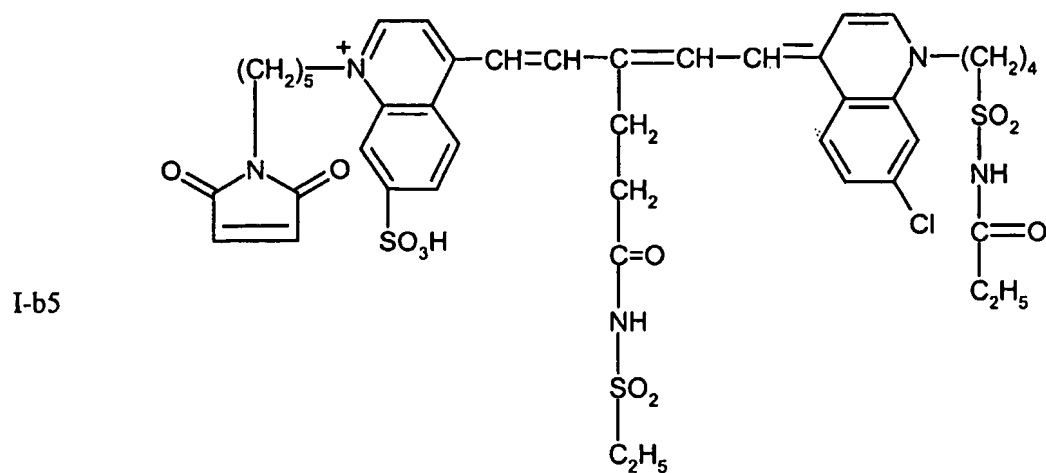
I-b3



I-b4



- 19 -



Formel 1-c

5

in der

Rc₁₁ bis Rc₁₁₀ unabhängig voneinander für einen beliebigen Substituenten stehen können,

10

m für 0,1,2,3 oder 4 steht,

Yc₁₁, Yc₁₂ und Yc₁₃ unabhängig voneinander für substituiertes oder unsubstituiertes C oder N stehen können wobei die Substituenten auch einen 5- oder 6-gliedrigen, aliphatischen oder aromatischen Carbo- oder Heterocyclus bilden können,

15

und

5 Bc_{11} für O, S, Se, Te, N- Rc_{111} , C(Rc_{112})(Rc_{113}) oder -C(Rc_{114})=C(Rc_{115})-, wobei Rc_{11} bis Rc_{115} unabhängig voneinander für H, gegebenenfalls substituiertes Alkyl, gegebenenfalls substituiertes Aryl oder gegebenenfalls substituiertes Alkenyl mit bis zu 20 C-Atomen stehen können, mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Substituenten Rc_{10} bis Rc_{115} ausgewählt ist aus der Gruppe, die gebildet wird durch $-(CH_2)_l-SO_2-Z-SO_2-R$, $-(CH_2)_l-CO-Z-SO_2-R$, $-(CH_2)_l-SO_2-Z-CO-R$, und $-(CH_2)_l-N(R)-SO_3^-$,

10

wobei

l für eine Zahl zwischen 1 und 6,

15 Z für NH oder N⁻ steht und

R bevorzugt für gegebenenfalls substituiertes Alkyl oder Aryl steht.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform bilden folgende Substituenten einen 5- oder 6gliedrigen Carbo- oder Heterocyclus der gegebenenfalls auch annelliert ist:

Der Substituent Rc_{11} zusammen mit Rc_{12} und/oder Rc_{14} , der Substituent Rc_{12} zusammen mit Rc_{13} und/oder Rc_{11} , der Substituent Rc_{14} zusammen mit Rc_{15} und/oder Rc_{11} .

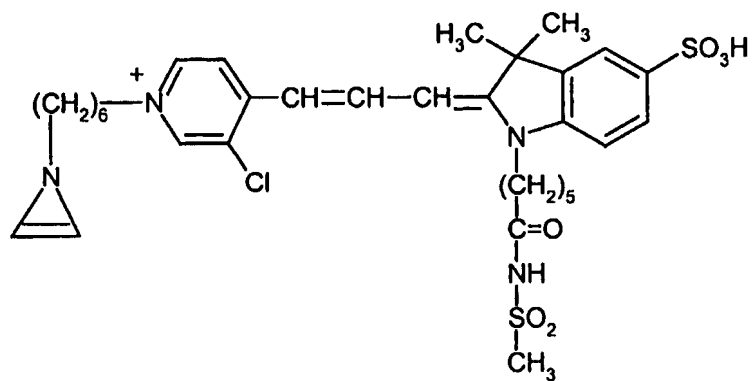
25

Vorzugsweise können die Substituenten Rc_{17} bis Rc_{110} die restlichen Glieder eines carbo-bzw. heterocyclischen Ringsystems bilden, das bis zu 4 Ringen enthalten kann, die gegebenenfalls mehrere Substituenten tragen können. Rc_{18} kann zusammen mit Rc_{19} eine π -Bindung bilden und Rc_{17} und Rc_{110} können Substituenten darstellen.

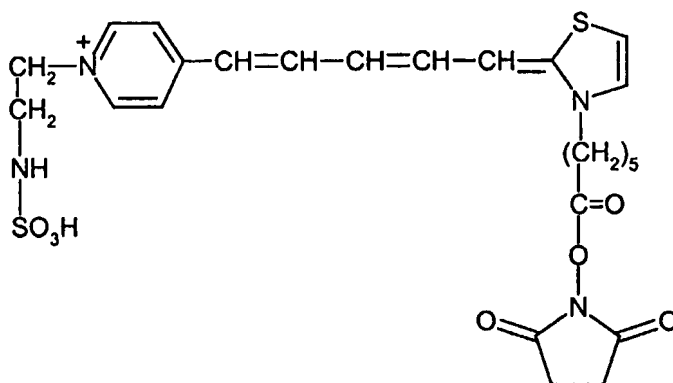
30

Besonders bevorzugte Verbindungen der Formel 1c:

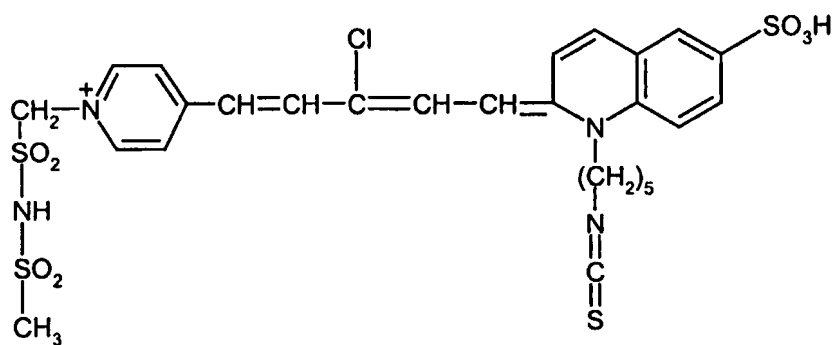
I-c1



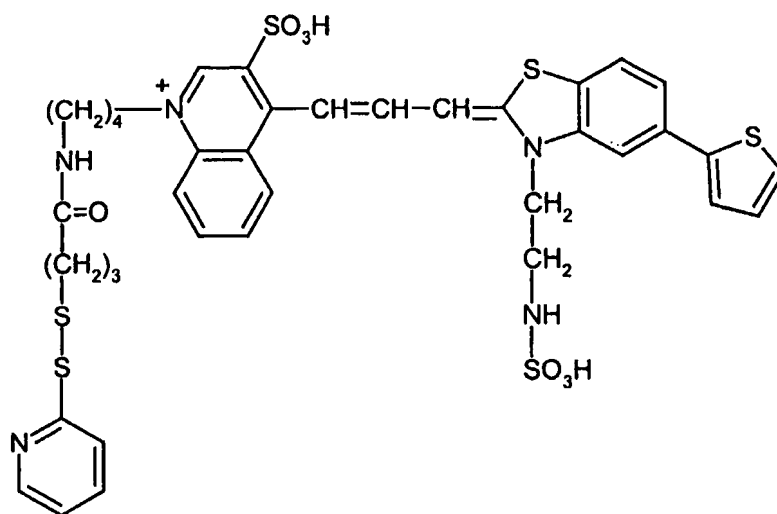
I-c2



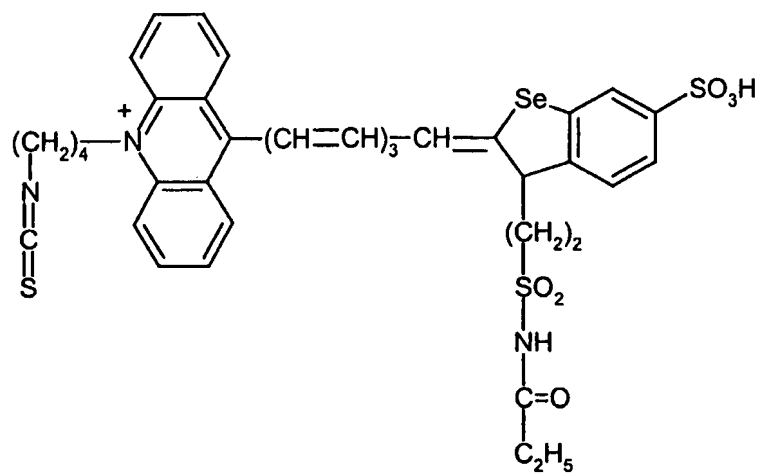
I-c3



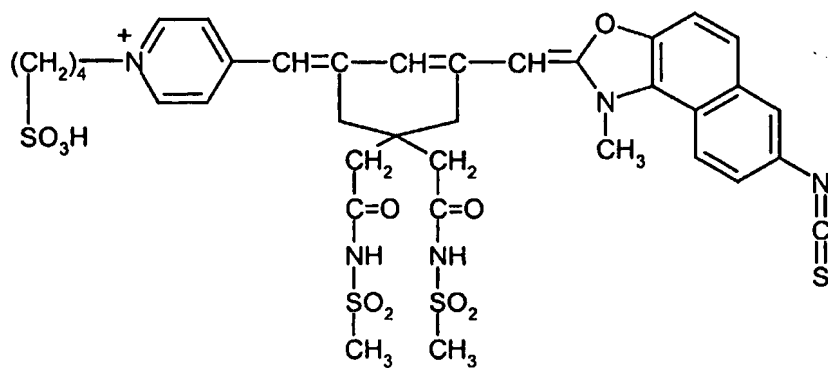
- 22 -



I-c4



I-c5

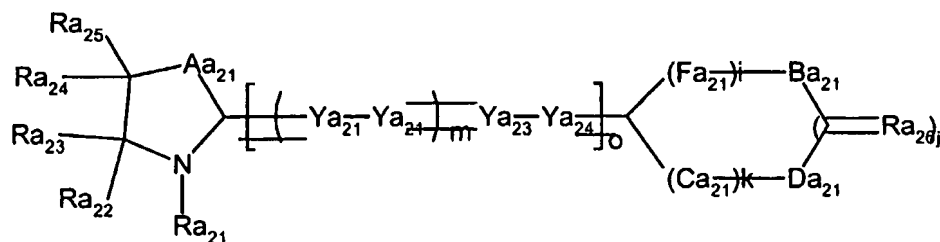


I-c6

2. Merocyanine

Im Sinne der vorliegenden Erfindung eignen sich insbesondere Merocyanine gemäß der Formeln 2a und/ oder 2b

5



Formel 2a

in der

10 Ra₂₁ bis Ra₂₅ unabhängig voneinander für einen beliebigen Substituenten stehen,

Ya₂₁, Ya₂₂, Ya₂₃, Ya₂₄ unabhängig voneinander für substituiertes oder unsubstituiertes C oder N stehen, wobei die Substituenten auch einen 5-oder 6gliedrigen, aliphatischen oder aromatischen Carbo-oder Heterocyclus bilden können.

15

m für 0,1,2,3,4

o für 0,1,2

20

Fa₂₁ und Ca₂₁ unabhängig voneinander für C=O, C=S oder C(Ra₂₇)=,

Ba₂₁ und Da₂₁ unabhängig voneinander für gegebenenfalls substituiertes C, N, O oder S steht,

25

Ra₂₆ für O, S, oder einen weiteren heterocyclischen, gegebenenfalls substituierten 5-oder 6-gliedrigen Ring steht

k,i,und j unabhängig voneinander für 0 oder 1 stehen

Ra₂₇, für H oder gegebenenfalls substituiertes Alkyl oder Aryl steht,

5

Aa₂₁ für O, S, Se, Te, N-Ra₂₈, C(Ra₂₉)(Ra₂₁₀), -C(Ra₂₁₁)=C(Ra₂₁₂)-,

wobei

10 Ra₂₈ bis Ra₂₁₂ für H oder gegebenenfalls substituiertes Alkyl, Aryl, oder Alkenyl mit bis zu 20 C-Atomen stehen können,

mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Substituenten Ra₂₁ bis Ra₂₅ bzw. Ra₂₇

bis Ra₂₁₂ ausgewählt ist aus der Gruppe, die gebildet wird durch -(CH₂)₁-SO₂-

15 Z-SO₂-R, -(CH₂)₁-CO-Z-SO₂-R, -(CH₂)₁-SO₂-Z-CO-R, und -(CH₂)₁-N(R)-SO₃⁻

,

wobei

20 l für eine Zahl zwischen 1 und 6,

Z für NH oder N⁻ steht und

R bevorzugt für gegebenenfalls substituiertes Alkyl oder Aryl steht.

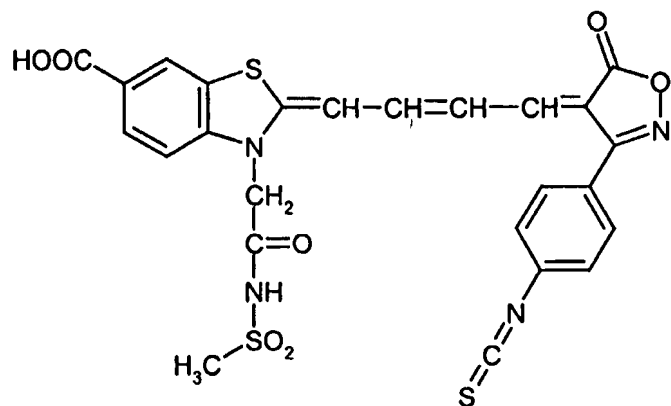
25

Vorzugsweise bilden die Substituenten Ra₂₂ bis Ra₂₅ die restlichen Glieder eines carbo- bzw. heterocyclischen Ringsystems, das bis zu 4 Ringen enthalten kann, die gegebenenfalls mehrere Substituenten tragen können. Ra₂₂ kann zusammen mit Ra₂₅ eine π-Bindung bilden und Ra₂₃ und Ra₂₄ können Substituenten darstellen.

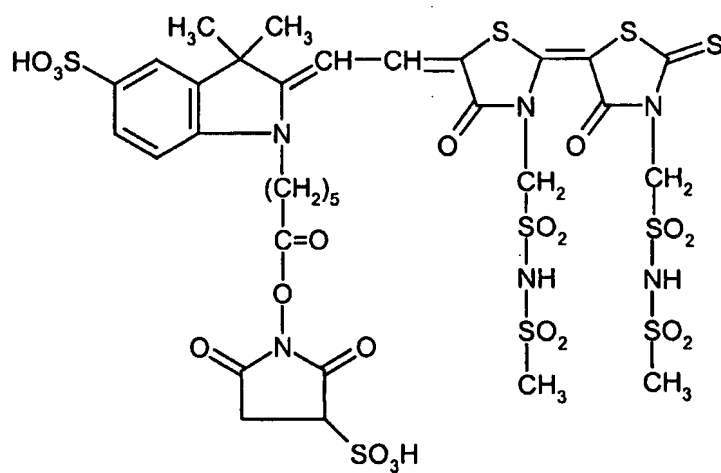
30

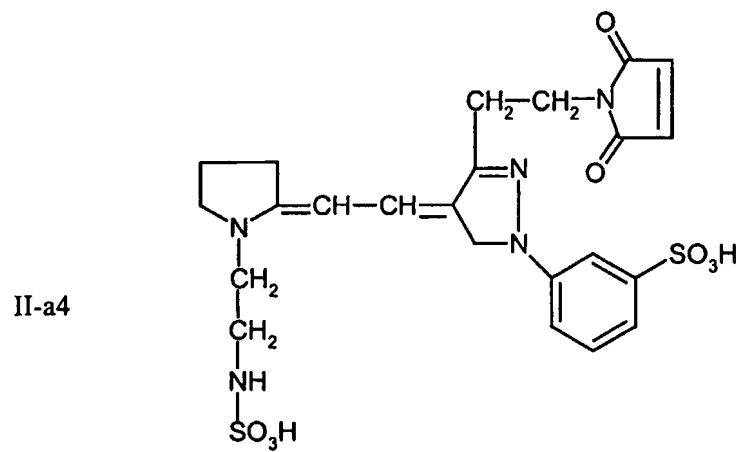
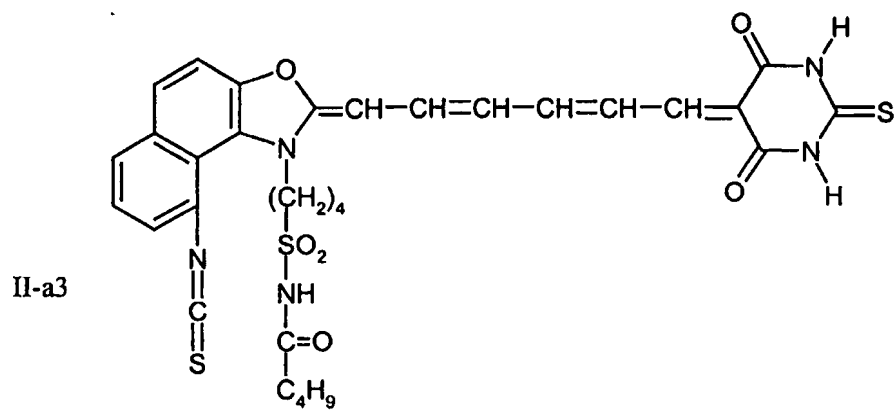
Besonders bevorzugte Verbindungen der Formel 2a:

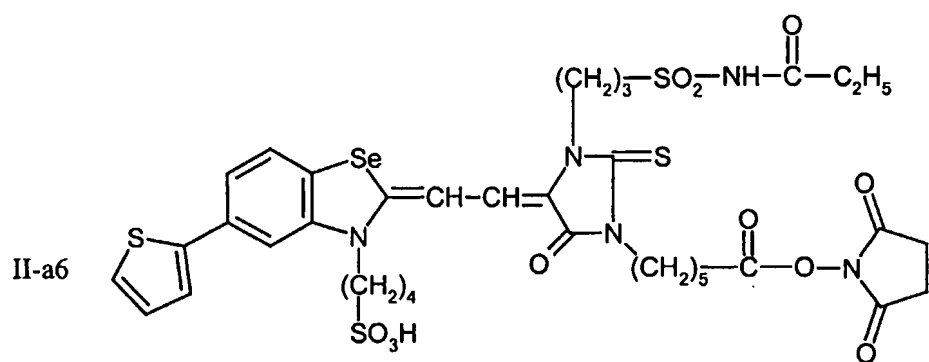
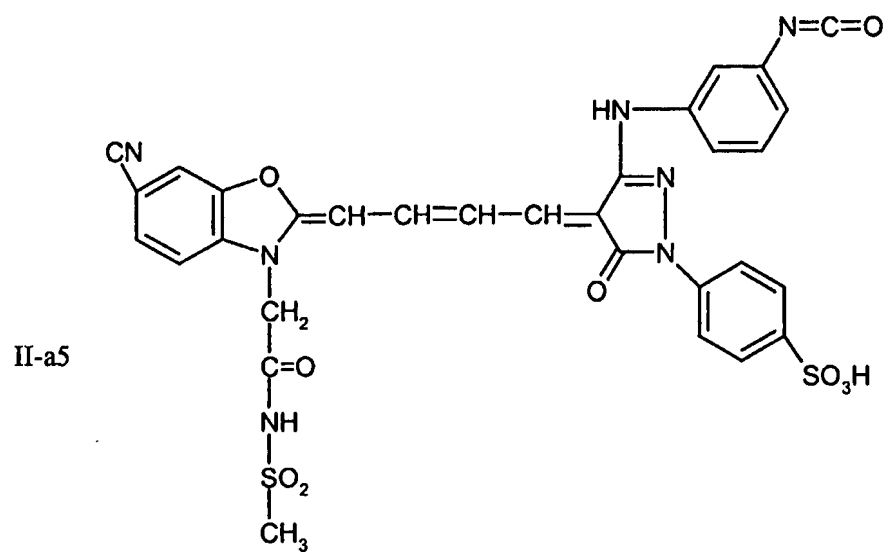
II-a1



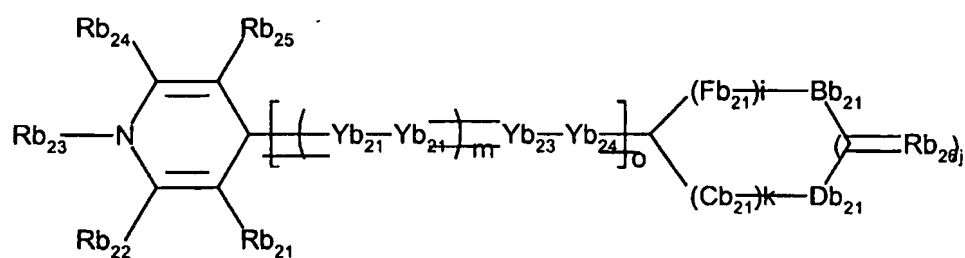
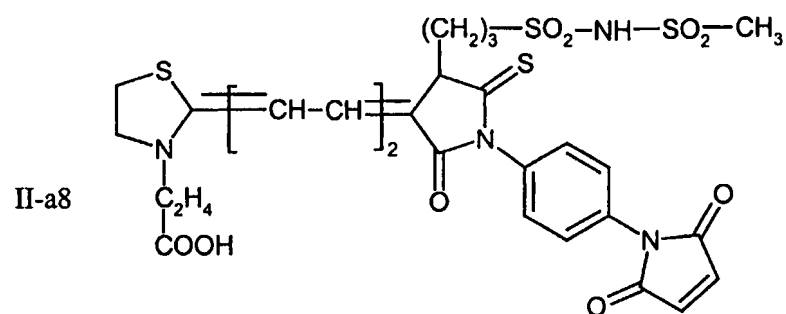
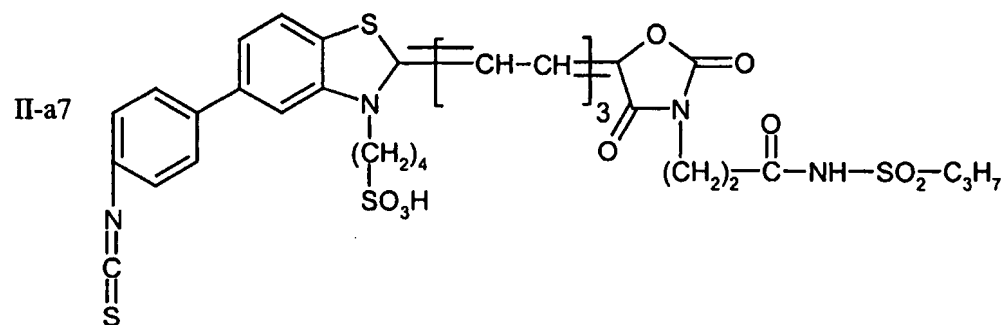
II-a2







- 28 -



Formel 2-b

in der

5

Rb₂₁ bis Rb₂₅ unabhängig voneinander für einen beliebigen Substituenten stehen,

Yb_{21} , Yb_{22} , Yb_{23} , Yb_{24} unabhängig voneinander für substituiertes oder unsubstituiertes C oder N stehen, wobei die Substituenten auch einen 5-oder 6gliedrigen, aliphatischen oder aromatischen Carbo-oder Heterocyclus bilden können.

5

m für 0,1,2,3 oder 4 steht

o für 0,1,2,3 oder 4 steht

10 Fb_{21} und Cb_{21} unabhängig voneinander für $C=O$, $C=S$ oder $C(Rb_{27})=$,

Bb_{21} und Db_{21} unabhängig voneinander für gegebenenfalls substituiertes C, N, O oder S steht,

15 Rb_{26} für O, S, oder einen weiteren heterocyclischen, gegebenenfalls substituierten 5-oder 6-gliedrigen Ring steht

k,i,und j unabhängig voneinander für 0 oder 1 stehen

20 Rb_{27} für H oder gegebenenfalls substituiertes Alkyl oder Aryl steht,

Vorzugsweise können folgende Substituenten einen 5-oder 6gliedrigen Carbo- oder Heterocyclus bilden, der gegebenenfalls auch annelliert ist:

25 Der Substituent Rb_{23} zusammen mit Rb_{24} und/oder Rb_{22} , der Substituent Rb_{22} zusammen mit Rb_{21} und/oder Rb_{23} , der Substituent Rb_{24} zusammen mit Rb_{25} und/oder Rb_{23} .

Ab_{21} : O, S, Se, Te, N- Rb_{28} , $C(Rb_{29})(Rb_{210})$, $-C(Rb_{211})=C(Rb_{212})-$,

30

- 30 -

Rb₂₈ bis Rb₂₁₂ können sein Wasserstoff, ggf. substituiertes Alkyl oder gegebenenfalls substituiertes Aryl, gegebenenfalls substituiertes Alkenyl, mit bis zu 20 C-Atomen, oder einer der unten angegebenen Substituenten,

- 5 mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Substituenten Rb₂₁ bis Rb₂₅ bzw. Rb₂₇ bis Rb₂₁₂ ausgewählt ist aus der Gruppe, die gebildet wird durch
 -(CH₂)_l-SO₂-Z-SO₂-R, -(CH₂)_l-CO-Z-SO₂-R, -(CH₂)_l-SO₂-Z-CO-R, und
 -(CH₂)_l-N(R)-SO₃⁻,

10 wobei

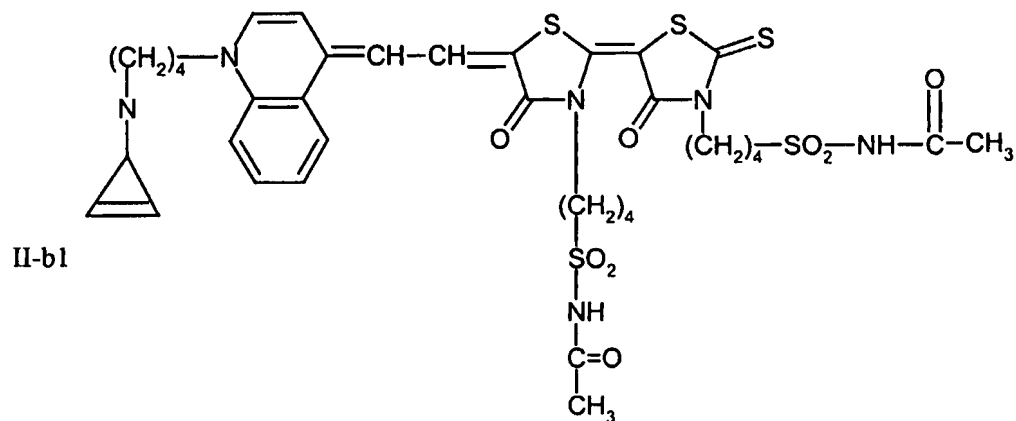
l für eine Zahl zwischen 1 und 6,

Z für NH oder N⁻ steht und

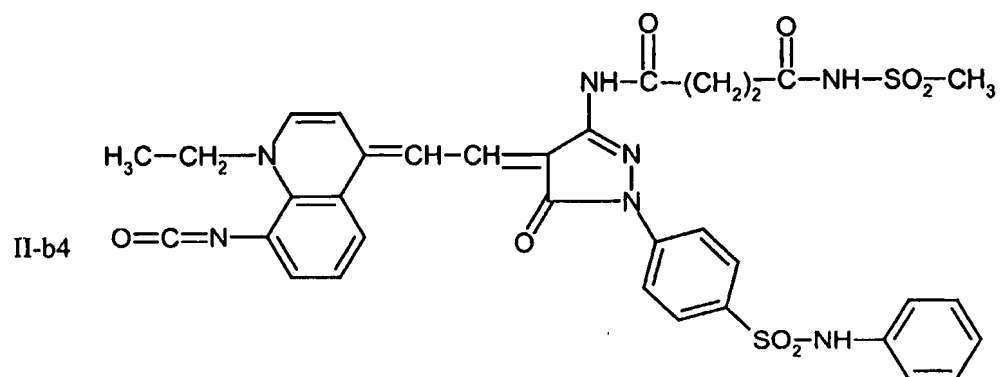
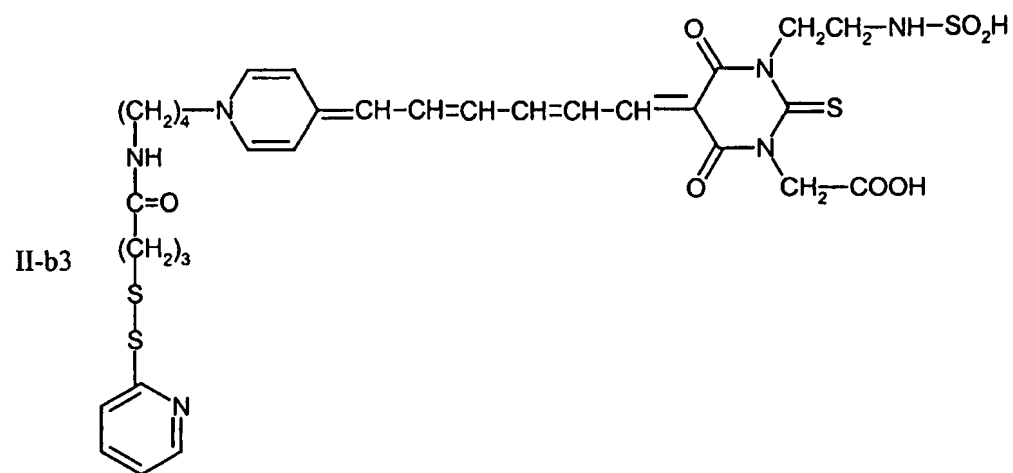
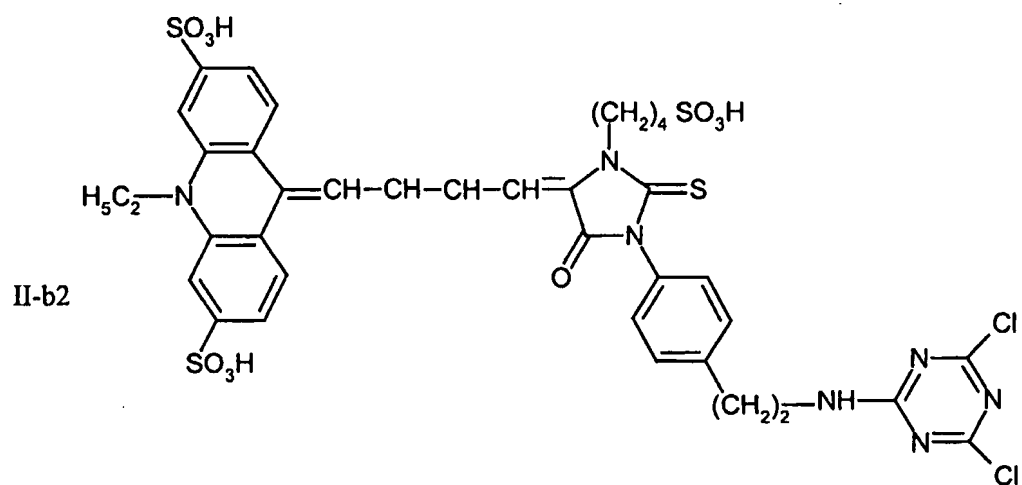
15

R bevorzugt für gegebenenfalls substituiertes Alkyl oder Aryl steht.

Besonders bevorzugte Verbindungen der Formel 2b



- 31 -

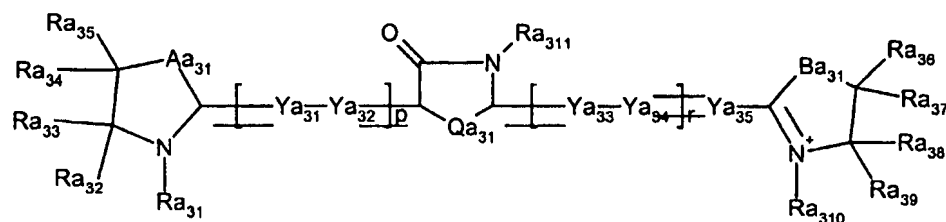


I-b5

Rhodacyanine

Als Rhodacyanine im Sinn der vorliegenden Anmeldung werden insbesondere solche der Formeln 3a und/ oder 3b eingesetzt.

5



Formel 3-a

in der

10

Ra₃₁ bis Ra₃₁₁ unabhängig voneinander für einen beliebigen Substituenten stehen,

Ya₃₁, Ya₃₂, Ya₃₃, Ya₃₄, Ya₃₅ unabhängig voneinander für substituiertes oder unsubstituiertes C bzw. N stehen, wobei die Substituenten auch einen 5-oder 6gliedrigen, aliphatischen oder aromatischen Carbo-oder Heterocyclus bilden können,

15

p und r unabhängig voneinander für 0,1 oder 2

20

Qa₃₁ für O; N(Ra₃₁₂), S oder Se

Aa₃₁, Ba₃₁ unabhängig voneinander für O, S, Se, Te, N-Ra₃₁₃, C(Ra₃₁₄) (Ra₃₁₅) oder -C(Ra₃₁₆)=C(Ra₃₁₇)- stehen, wobei Ra₃₁₂ bis Ra₃₁₇ für H, gegebenenfalls substituiertes Alkyl, Aryl oder Alkenyl, mit bis zu 20 C-Atomen oder für einen beliebigen Substituenten stehen können.

25

mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Substituenten R_{a31} bis R_{a17} ausgewählt ist aus der Gruppe, die gebildet wird durch $-(CH_2)_l-SO_2-Z-SO_2-R$, $-(CH_2)_l-CO-Z-SO_2-R$, $-(CH_2)_l-SO_2-Z-CO-R$, und $-(CH_2)_l-N(R)-SO_3^-$,

5 wobei

l für eine Zahl zwischen 1 und 6,

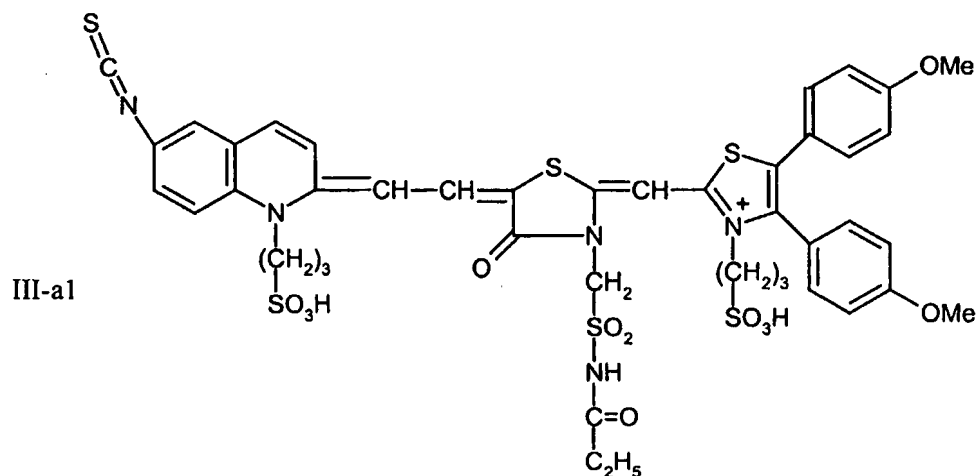
Z für NH oder N^+ steht und

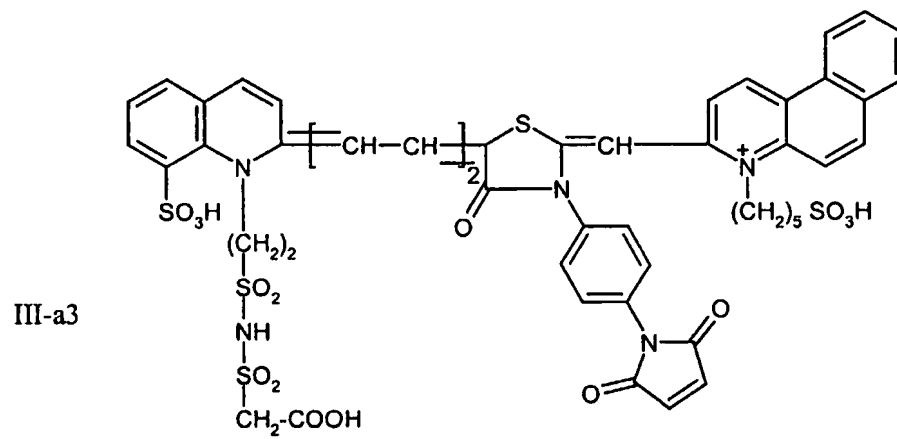
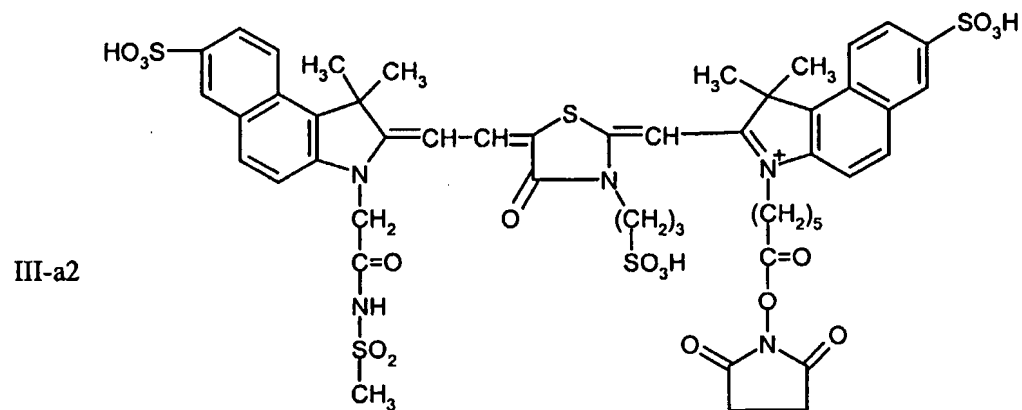
10

R bevorzugt für gegebenenfalls substituiertes Alkyl oder Aryl steht.

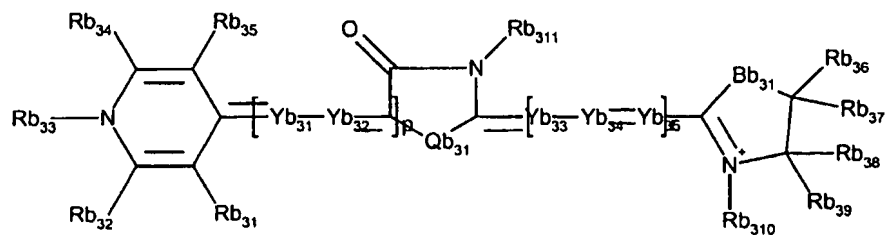
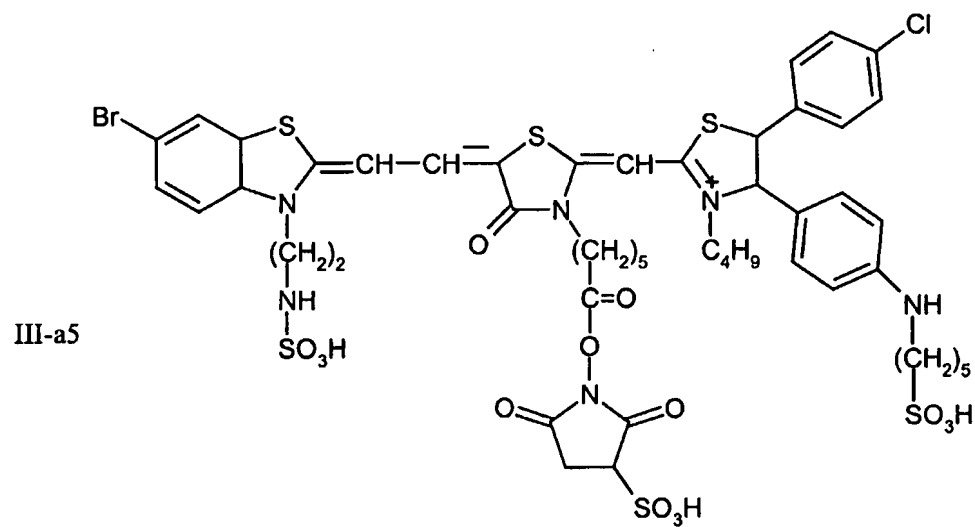
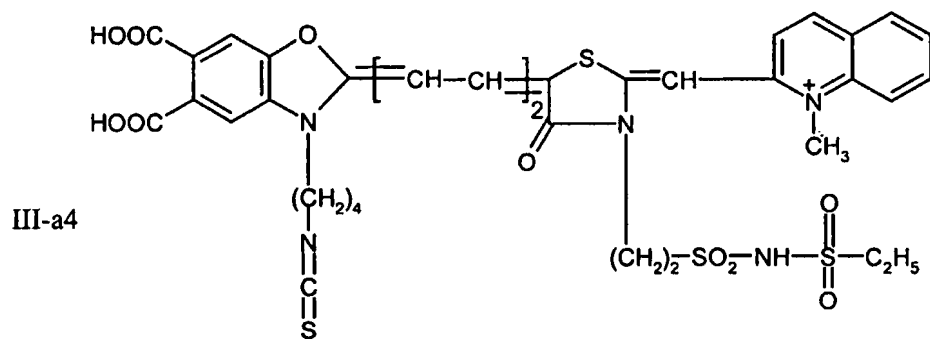
In einer bevorzugten Ausführungsform bilden die Substituenten R_{a32} bis R_{a35} bzw. R_{a36} bis R_{a39} die restlichen Glieder eines carbo-bzw. heterocyclischen Ringsystems, das bis zu 4 Ringen enthalten kann, die gegebenenfalls mehrere Substituenten tragen können. R_{a32} kann zusammen mit R_{a35} und /oder R_{a36} zusammen mit R_{a39} eine π -Bindung bilden und R_{a33} und R_{a34} bzw. R_{a37} und R_{a38} können Substituenten darstellen.

Besonders bevorzugte Verbindungen der Formel 3a





- 35 -



Formel 3-b

5

in der

- 36 -

Rb₃₁ bis Rb₃₁₁ unabhängig voneinander für einen beliebigen Substituenten stehen,

5 Yb₃₁, Yb₃₂, Yb₃₃, Yb₃₄, Yb₃₅ unabhängig voneinander für substituiertes oder unsubstituiertes C bzw. N stehen, wobei die Substituenten auch einen 5- oder 6gliedrigen, aliphatischen oder aromatischen Carbo- oder Heterocyclus bilden können,

10 p und r unabhängig voneinander für 0,1 oder 2

Qb₃₁ für O; N(Rb₃₁₂), S oder Se

15 Ab₃₁, Bb₃₁ unabhängig voneinander für O, S, Se, Te, N-Rb₃₁₃, C(Rb₃₁₄)(Rb₃₁₅) oder -C(Rb₃₁₆)=C(Rb₃₁₇)- stehen, wobei Rb₃₁₁ bis Rb₃₁₇ für H, gegebenenfalls substituiertes Alkyl, Aryl oder Alkenyl, mit bis zu 20 C-Atomen oder für einen beliebigen Substituenten stehen können,

20 mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Substituenten Rb₃₁ bis Rb₃₁₇ ausgewählt ist aus der Gruppe, die gebildet wird durch -(CH₂)₁-SO₂-Z-SO₂-R, -(CH₂)₁-CO-Z-SO₂-R, -(CH₂)₁-SO₂-Z-CO-R, und -(CH₂)₁-N(R)-SO₃⁻,

wobei

25 l für eine Zahl zwischen 1 und 6,

Z für NH oder N⁻ steht und

R bevorzugt für gegebenenfalls substituiertes Alkyl oder Aryl steht.

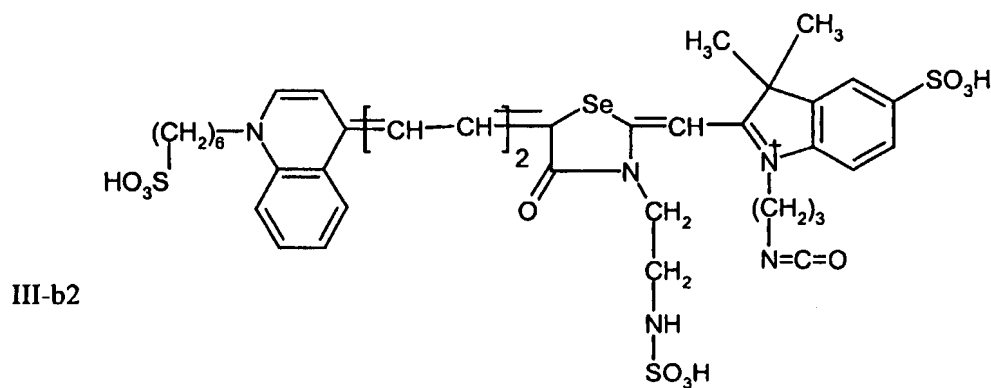
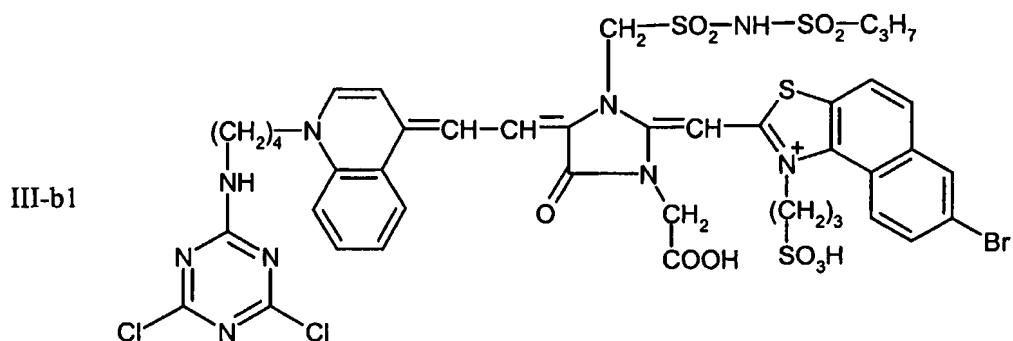
30 In einer bevorzugten Ausführungsform bilden die Substituenten Rb₃₆ bis Rb₃₉ die restlichen Glieder eines carbo- bzw. heterocyclischen Ringsystems, das bis zu 4

Ringe enthalten kann, die gegebenenfalls mehrere Substituenten tragen können. Rb₃₆ kann zusammen mit Rb₃₉ eine π -Bindung bilden und Ra₃₇ und Ra₃₈ können Substituenten darstellen. Folgende Substituenten können einen 5- oder 6gliedrigen Carbo- oder Heterocyclus bilden, der ggf. auch annelliert ist:

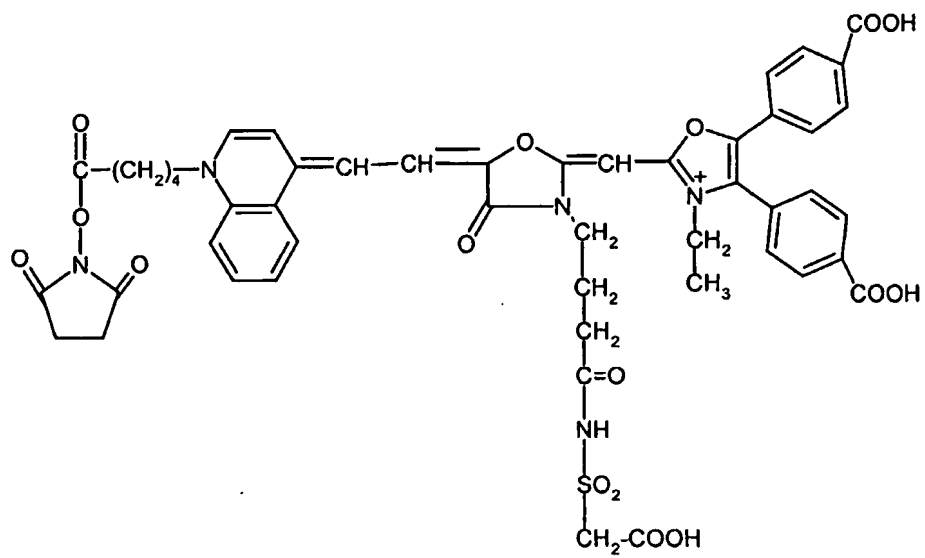
5

Der Substituent Rb₃₃ zusammen mit Rb₃₂ und/oder Rb₃₄, der Substituent Rb₃₂ zusammen mit Rb₃₃ und/oder Rb₃₁, der Substituent Rb₃₄ zusammen mit Rb₃₅ und/oder Rb₃₃.

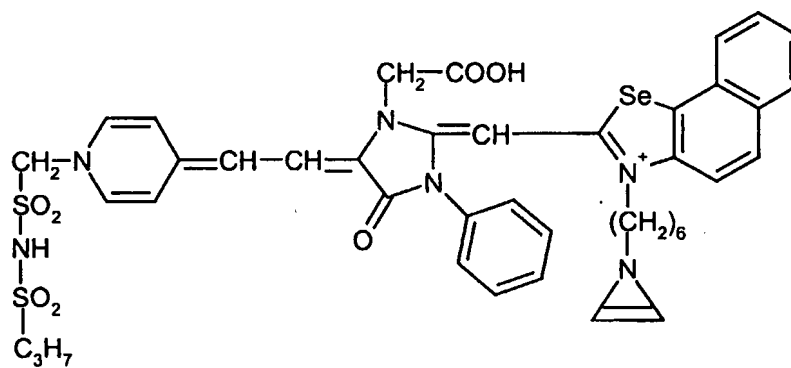
Besonders bevorzugte Verbindungen der Formel 3b



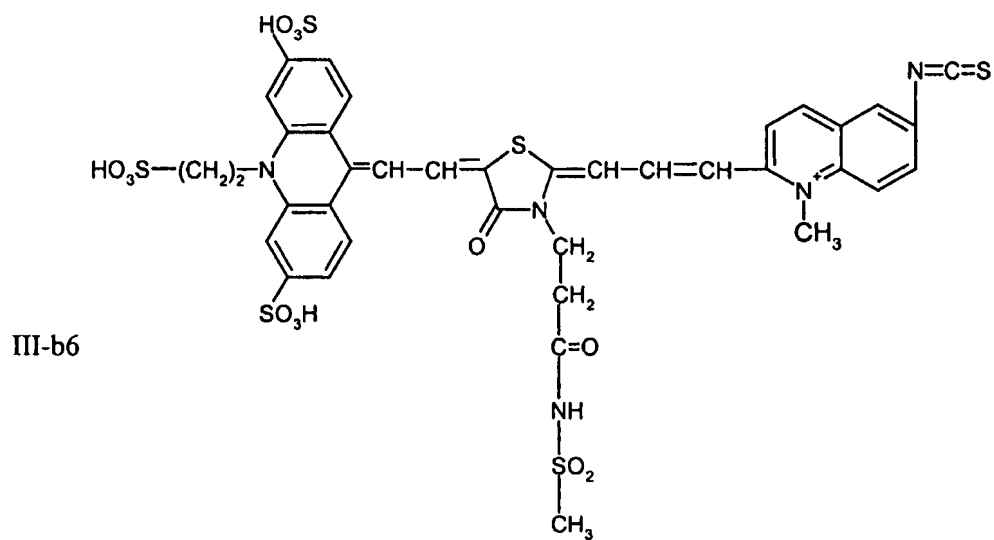
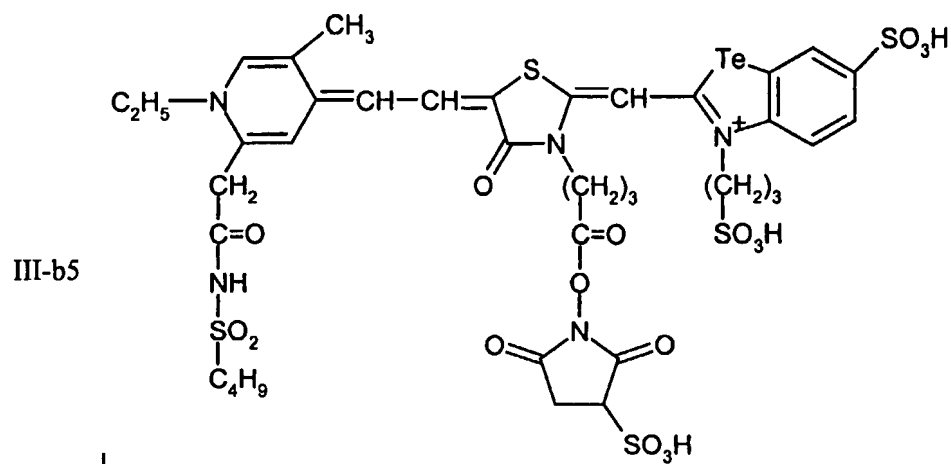
III-b3



III-b4



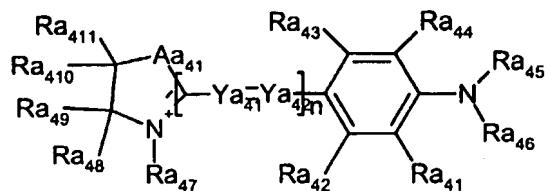
- 39 -



Styrylfarbstoffe

Besonders bevorzugt einzusetzende Styrylfarbstoffe im Sinne der vorliegenden Er-
 5 findung sind die Verbindungen der Formeln 4a, 4b, 4c und/ oder 4d.

- 40 -



Formel 4-a

5 in der

Ra₄₁ bis Ra₄₁₁ unabhängig voneinander für einen beliebigen Substituenten stehen ,

10 Ya₄₁ und Ya₄₂ unabhängig voneinander für substituiertes oder unsubstituiertes C bzw. N, wobei die Substituenten auch einen 5-oder 6gliedrigen, aliphatischen oder aromatischen Carbo-oder Heterocyclus bilden können.

15 Aa₄ für O, S, Se, Te, N-Ra₄₁₂, C(Ra₄₁₃)(Ra₄₁₄) oder -C(Ra₄₁₅)=C(Ra₄₁₆)-, steht, wobei Ra₄₁₂ bis Ra₄₁₆ für H, gegebenenfalls substituiertes Alkyl, Aryl, oder Alkenyl, mit bis zu 20 C-Atomen oder einen beliebigen Substituenten stehen können,

20 mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Substituenten Ra₄₁ bis Ra₄₁₆ ausgewählt ist aus der Gruppe, die gebildet wird durch -(CH₂)₁-SO₂-Z-SO₂-R, -(CH₂)₁-CO-Z-SO₂-R, -(CH₂)₁-SO₂-Z-CO-R, und -(CH₂)₁-N(R)-SO₃⁻,

wobei

25 1 für eine Zahl zwischen 1 und 6,

Z für NH oder N⁻ steht und

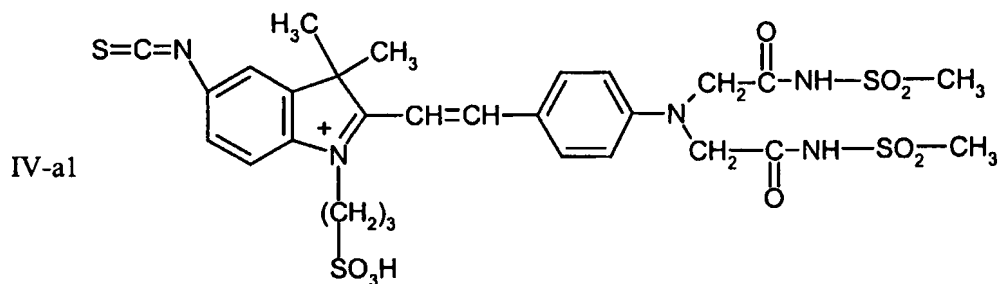
R bevorzugt für gegebenenfalls substituiertes Alkyl oder Aryl steht.

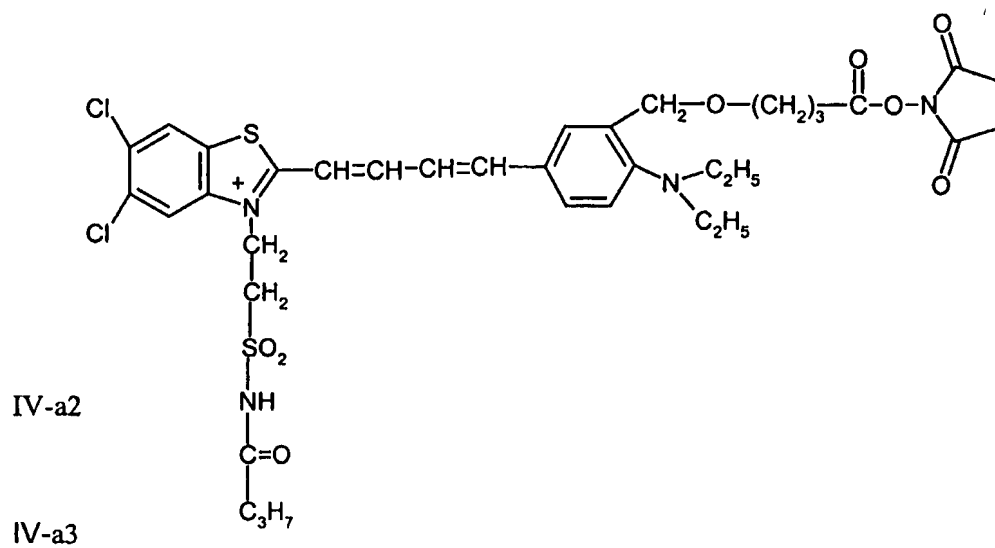
In einer bevorzugten Ausführungsform bilden die Substituenten Ra₄₈ bis Ra₄₁₁ die restlichen Glieder eines carbo- bzw. heterocyclischen Ringsystems, das bis zu 4
5 Ringen enthalten kann, die gegebenenfalls mehrere Substituenten tragen können. Ra₄₈ kann zusammen mit Ra₄₁₁ eine π -Bindung bilden und Ra₄₉ und Ra₄₁₀ können Substituenten darstellen.

Folgende Substituenten können einen 5-oder 6gliedrigen Carbo-oder Heterocyclus
10 bilden, der gegebenenfalls auch annelliert ist:

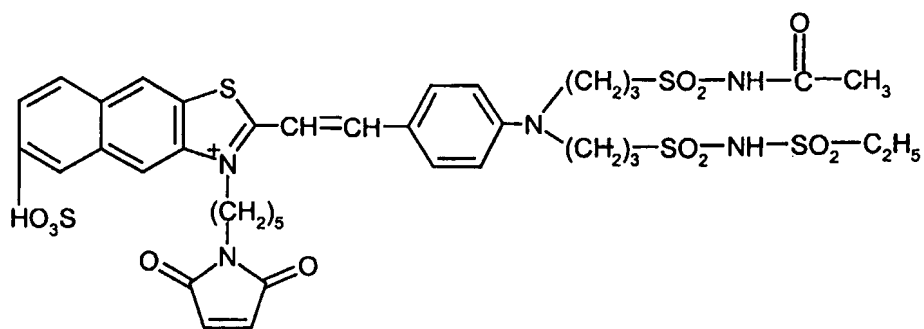
Der Substituent Ra₄₅ zusammen mit Ra₄₆ oder Ra₄₅ mit Ra₄₄, oder Ra₄₆ mit Ra₄₁, und/oder Ra₄₁ mit Ra₄₂ und/oder Ra₄₄ mit Ra₄₃.

Besonders bevorzugte Verbindungen der Formel 4a

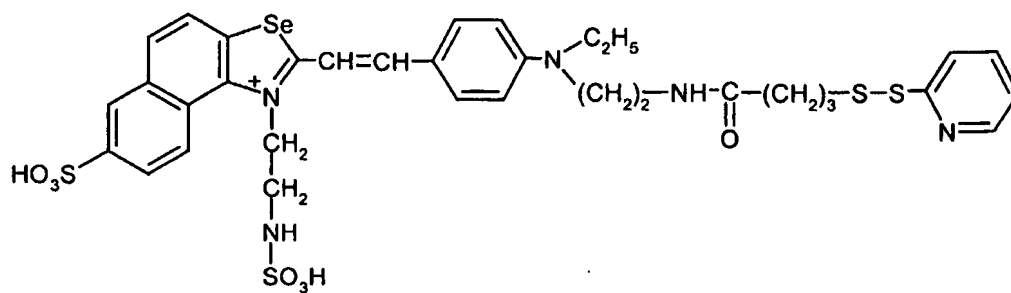




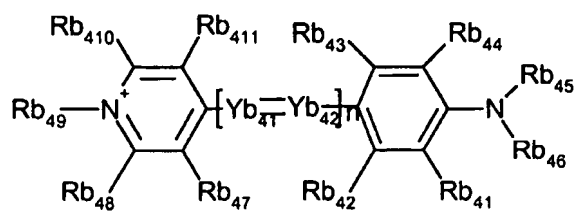
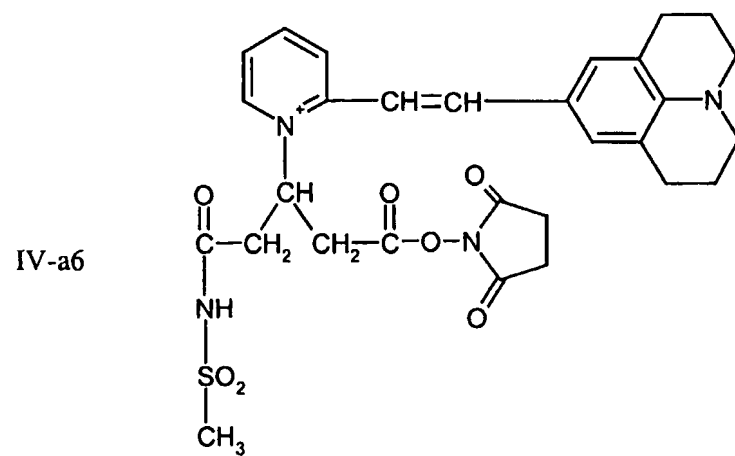
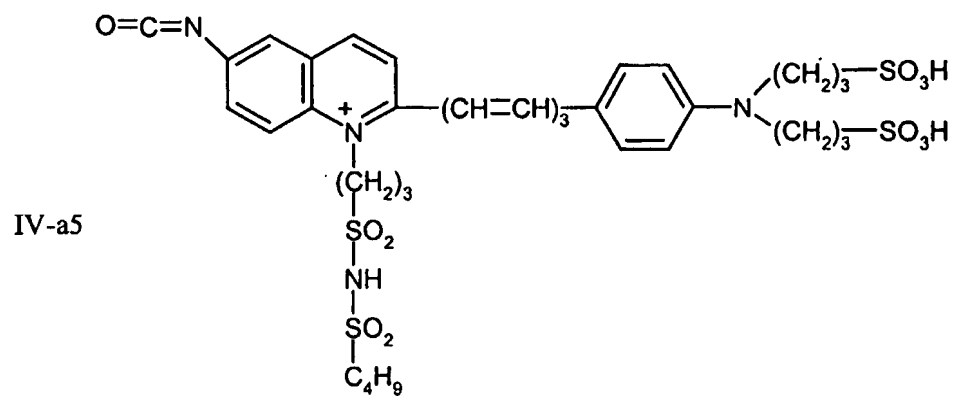
IV-a3



VI-
IV-a4
a4



- 43 -



Formel 4-b

in der

Rb₄₁ bis Rb₄₁₁ unabhängig voneinander für einen beliebigen Substituenten stehen ,

5

Yb₄₁ und Yb₄₂ unabhängig voneinander für substituiertes oder unsubstituiertes C bzw. N, wobei die Substituenten auch einen 5-oder 6-gliedrigen, aliphatischen oder aromatischen Carbo-oder Heterocyclus bilden können und

10

n für 0,1,2,3, 4 oder 5 steht,

mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Substituenten Rb₄₁ bis Rb₄₁₁ ausgewählt ist aus der Gruppe, die gebildet wird durch -(CH₂)_l-SO₂-Z-SO₂-R, -(CH₂)_l-CO-Z-SO₂-R, -(CH₂)_l-SO₂-Z-CO-R, und -(CH₂)_l-N(R)-SO₃⁻,

15

wobei

l für eine Zahl zwischen 1 und 6,

20

Z für NH oder N⁺ steht und

R bevorzugt für gegebenenfalls substituiertes Alkyl oder Aryl steht.

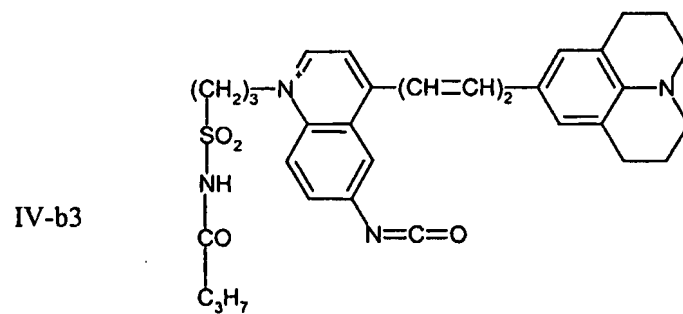
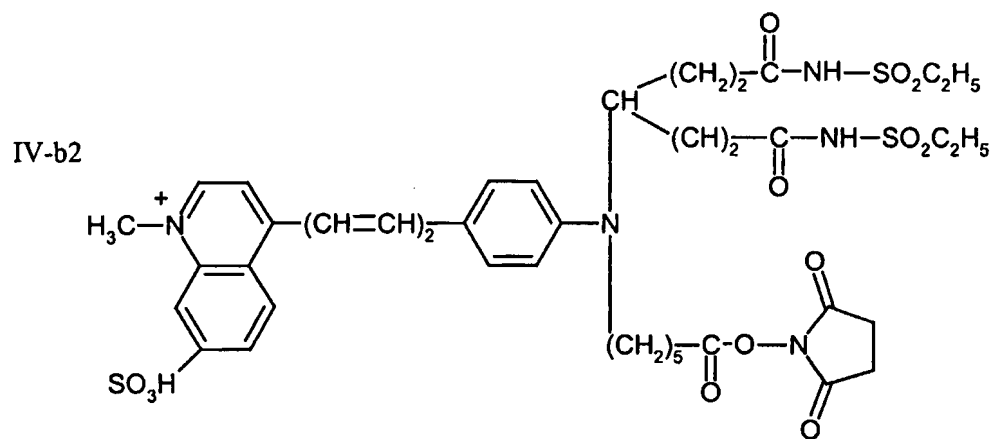
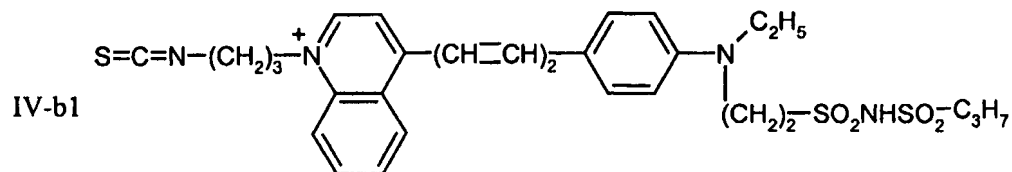
25 In einer bevorzugten Ausführungsform bilden folgende Substituenten einen 5-oder 6gliedrigen Carbo-oder Heterocyclus, der gegebenenfalls auch annelliert ist:

Der Substituent Rb₄₅ zusammen mit Rb₄₆ und/oder Rb₄₅ mit Rb₄₄, und/oder Rb₄₆ mit Rb₄₁, und/oder Rb₄₁ mit Rb₄₂ und/oder Rb₄₄ mit Rb₄₃.

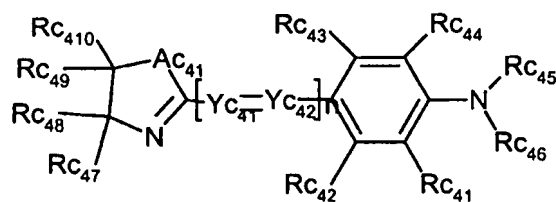
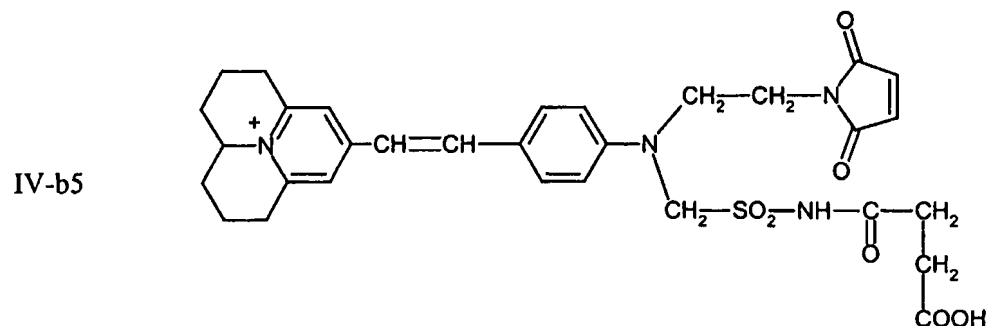
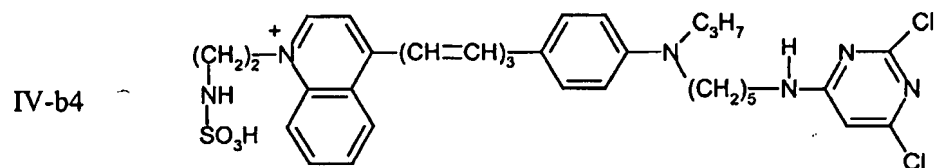
30

Der Substituent Rb₄₉ zusammen mit Rb₄₁₀ und/oder Rb₄₈, der Substituent Rb₄₁₀ zusammen mit Rb₄₁₁ und/oder der Substituent Rb₄₈ zusammen mit Rb₄₇.

Besonders bevorzugte Verbindungen der Formel 4b



- 46 -



Formel 4-c

5 in der

Rc₄₁ bis Rc₄₁₀

unabhängig voneinander für einen beliebigen Substituenten stehen ,

10 Yc₄₁ und Yc₄₂

unabhängig voneinander für substituiertes oder unsubstituiertes C bzw. N, wobei die Substituenten auch einen 5- oder 6-gliedrigen, aliphatischen oder aromatischen Carbo- oder Heterocyclus bilden können,

15 Ac₄₁

für O, S, Se, Te, N-Rc₄₁₁, C(Rc₄₁₂)(Rc₄₁₃) oder -C(Rc₄₁₄)=C(Rc₄₁₅)-, steht, wobei Rc₄₁₁ bis Rc₄₁₅ für H, ge-

- 47 -

gegebenenfalls substituiertes Alkyl, Aryl, oder Alkenyl, mit bis zu 20 C-Atomen oder einen beliebigen Substituenten stehen können und

5 n für 0,1,2,3,4 oder 5 stehen kann,

mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Substituenten Rc₄₁ bis Rc₄₁₅ ausgewählt ist aus der Gruppe, die gebildet wird durch -(CH₂)_i-SO₂-Z-SO₂-R, -(CH₂)_i-CO-Z-SO₂-R, -(CH₂)_i-SO₂-Z-CO-R, und -(CH₂)_i-N(R)-SO₃⁻,

10

wobei

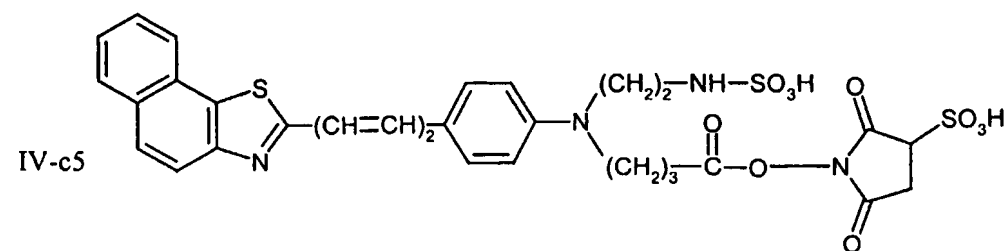
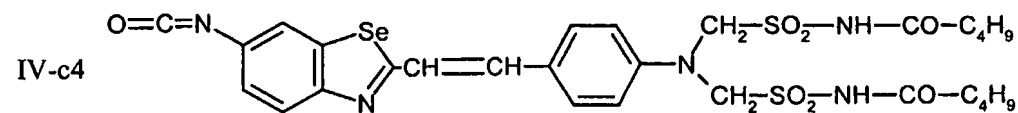
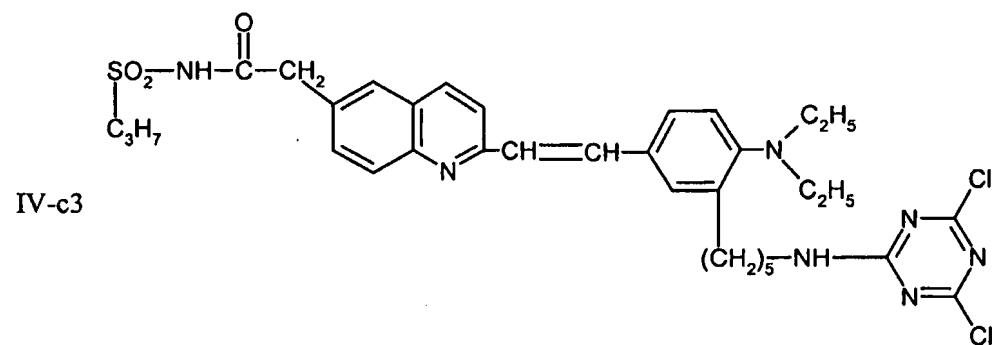
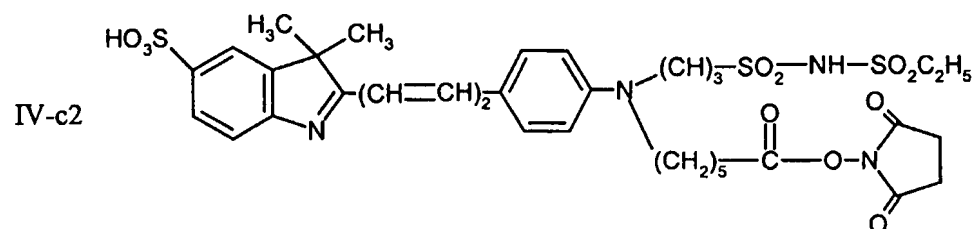
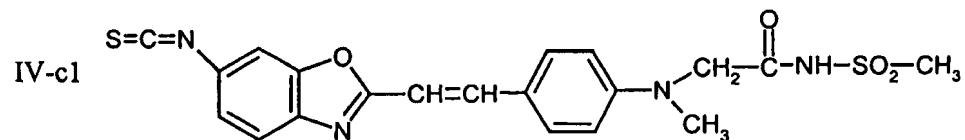
l für eine Zahl zwischen 1 und 6,

15 Z für NH oder N⁻ steht und

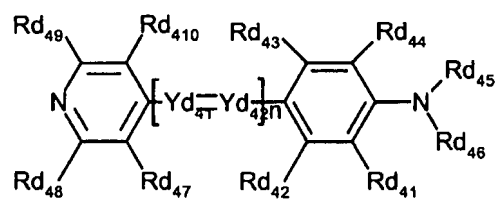
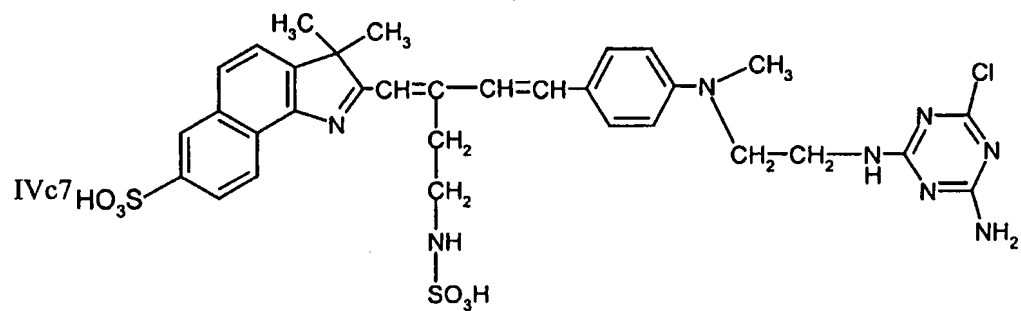
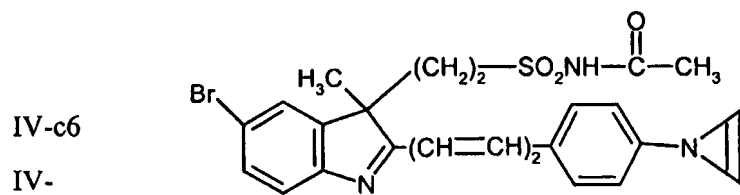
R bevorzugt für gegebenenfalls substituiertes Alkyl oder Aryl steht.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform können folgende Substituenten einen 5-oder 6gliedrigen Carbo-oder Heterocyclus bilden, der gegebenenfalls auch annelliert ist: Der Substituent Rc₄₅ zusammen mit Rc₄₆ oder Rc₄₅ mit Rc₄₄, oder Rc₄₆ mit Rc₄₁, und/oder Rc₄₁ mit Rc₄₂ und/oder Rc₄₄ mit Rc₄₃.

25 Die Substituenten Rc₄₇ bis Rc₄₁₀ bilden die restlichen Glieder eines carbo-bzw. heterocyclischen Ringsystems, das bis zu 4 Ringen enthalten kann, die gegebenenfalls mehrere Substituenten tragen können. Rc₄₇ kann zusammen mit Rc₄₁₀ eine π-Bindung bilden und Rc₄₈ und Rc₄₉ können Substituenten darstellen.

Besonders bevorzugt einzusetzende Verbindungen der Formel 4c

- 49 -



Formel 4-d

5 in der

Rd₄₁ bis Rd₄₁₀

unabhängig voneinander für einen beliebigen Substituenten stehen ,

Yd₄₁ und Yd₄₂ unabhängig voneinander für substituiertes oder unsubstituiertes C bzw. N, wobei die Substituenten auch einen 5- oder 6gliedrigen, aliphatischen oder aromatischen Carbo- oder Heterocyclus bilden können und

5

n für 0,1,2,3,4 oder 5 stehen kann,

mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Substituenten Rd₄₁ bis Rd₄₁₀ ausgewählt ist aus der Gruppe, die gebildet wird durch -(CH₂)_l-SO₂-Z-SO₂-R, -(CH₂)_l-CO-Z-SO₂-R, -(CH₂)_l-SO₂-Z-CO-R, und -(CH₂)_l-N(R)-SO₃⁻,

10

wobei

l für eine Zahl zwischen 1 und 6,

15

Z für NH oder N⁻ steht und

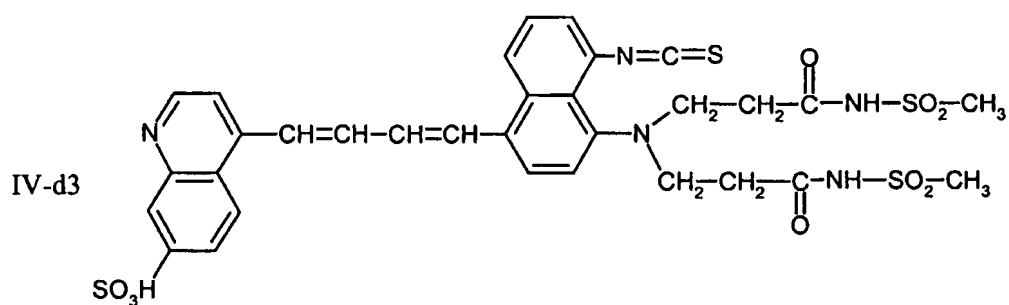
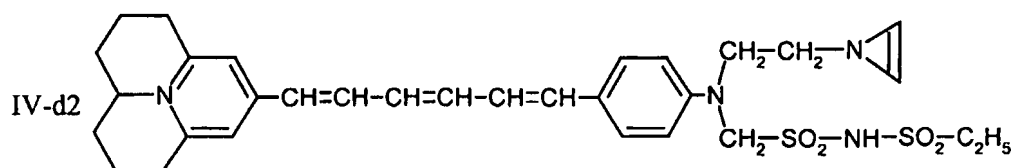
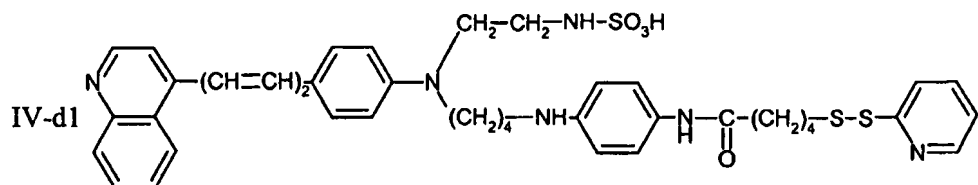
R bevorzugt für gegebenenfalls substituiertes Alkyl oder Aryl steht.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform können folgende Substituenten einen 5- oder 6gliedrigen Carbo- oder Heterocyclus bilden, der gegebenenfalls auch annelliert ist:

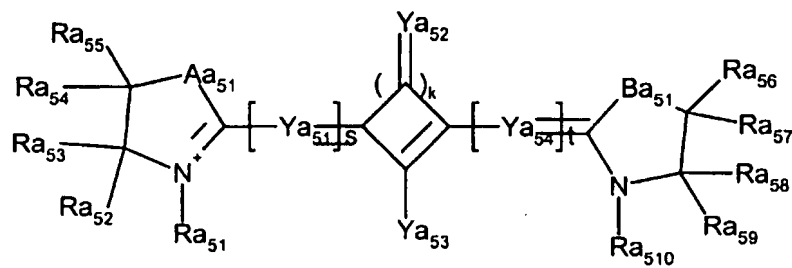
Der Substituent Rd₄₅ zusammen mit Rd₄₆ und/oder Rd₄₅ mit Rd₄₄, und/oder Rd₄₆ mit Rd₄₁, und/oder Rd₄₁ mit Rd₄₂ und/oder Rd₄₄ mit Rd₄₃.

25

Der Substituent Rd₄₉ zusammen mit Rd₄₁₀, und/oder der Substituent Rd₄₈ zusammen mit Rd₄₇.

Besonders bevorzugt einzusetzende Verbindungen der Formel 4d**5. Quadratsäuren**

Im Sinn der vorliegenden Erfindung bevorzugt einzusetzende Quadratsäuren sind jene der Formeln 5a, 5b und/ oder 5c



Formel 5-a

in der

	Ra ₅₁ bis Ra ₅₁₀	unabhängig voneinander für einen beliebigen Substituenten stehen können
5	Ya ₅₁ bis Ya ₅₄	unabhängig voneinander für substituiertes oder unsubstituiertes C bzw. N, wobei die Substituenten auch einen 5- oder 6-gliedrigen, aliphatischen oder aromatischen Carbo- oder Heterocyclus bilden können.
10	s und t	unabhängig voneinander für 0, 1, 2 oder 3 stehen,
	k	für 1 oder 2 steht,
15	Ya ₅₂	für O, S, oder =NRa ₅₁₁ ,
	Ya ₅₃	für O-Ra ₅₁₂ , S-Ra ₅₁₃ oder N(Ra ₅₁₄)(Ra ₅₁₅),
20	wobei	Ra ₅₁₁ bis Ra ₅₁₅ unabhängig voneinander für einen beliebigen Substituenten stehen können
25	Aa ₅₁ und Ba ₅₁	unabhängig voneinander für O, S, Se, Te, N-Ra ₅₁₆ , C(Ra ₅₁₇)(Ra ₅₁₈) oder -C(Ra ₅₁₉)=C(Ra ₅₂₀)-, stehen, wobei Ra ₅₁₆ bis Ra ₅₂₀ für einen beliebigen Substituenten, vorzugsweise für H, gegebenenfalls substituiertes Alkyl, Aryl oder Alkenyl, mit bis zu 20 C-Atomen stehen können,

mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Substituenten Ra₅₁ bis Ra₅₂₀ ausgewählt ist aus der Gruppe, die gebildet wird durch -(CH₂)₁-SO₂-Z-SO₂-R, -(CH₂)₁-CO-Z-SO₂-R, -(CH₂)₁-SO₂-Z-CO-R, und -(CH₂)₁-N(R)-SO₃⁻,

wobei

1 für eine Zahl zwischen 1 und 6,

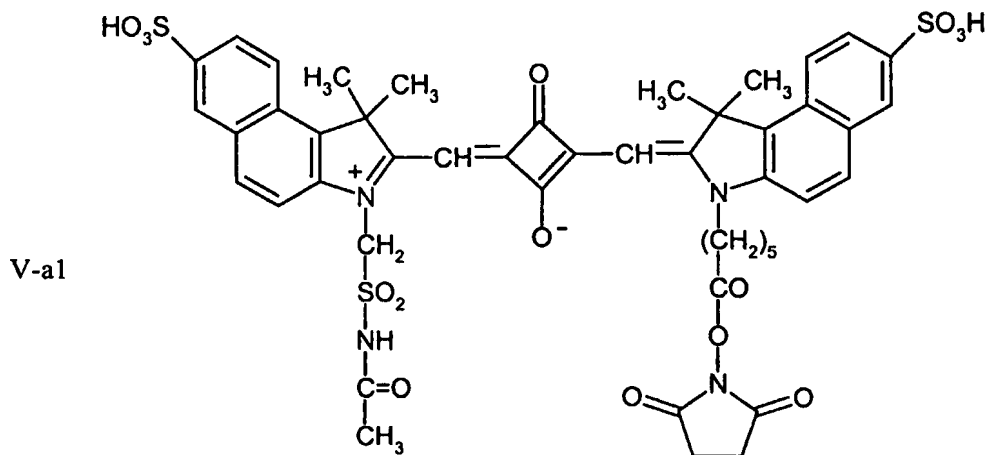
5 Z für NH oder N⁺ steht und

R bevorzugt für gegebenenfalls substituiertes Alkyl oder Aryl steht.

10 In einer bevorzugten Ausführungsform bilden die Substituenten Ra₅₂ bis Ra₅₅ bzw. Ra₅₆ bis Ra₅₉ die restlichen Glieder eines carbo- bzw. heterocyclischen Ringsystems, das bis zu 4 Ringen enthalten kann, die gegebenenfalls mehrere Substituenten tragen können. Ra₅₂ kann zusammen mit Ra₅₅ und /oder Ra₅₆ zusammen mit Ra₅₉ eine π -Bindung bilden und Ra₅₃ und Ra₅₄ bzw. Ra₅₇ und Ra₅₈ können Substituenten darstellen.

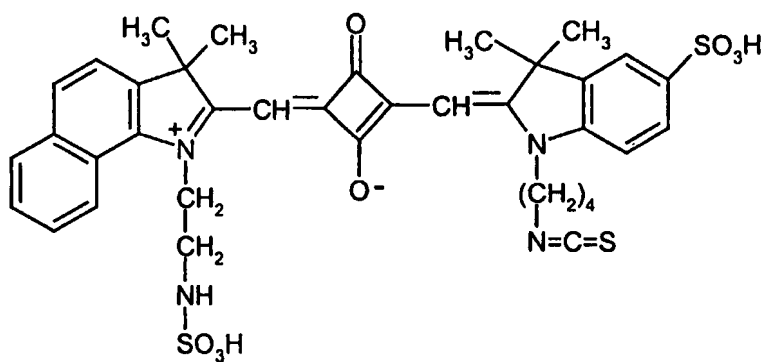
15

Besonders bevorzugte Verbindungen der Formel 5a

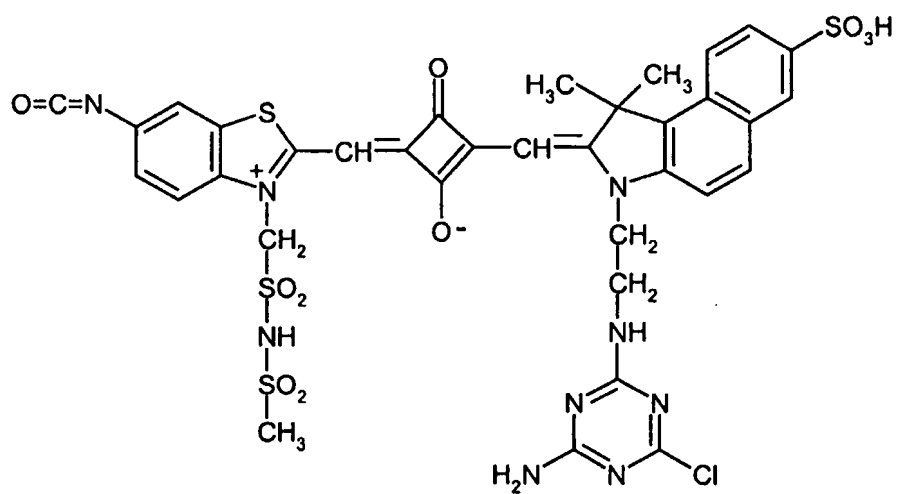


- 54 -

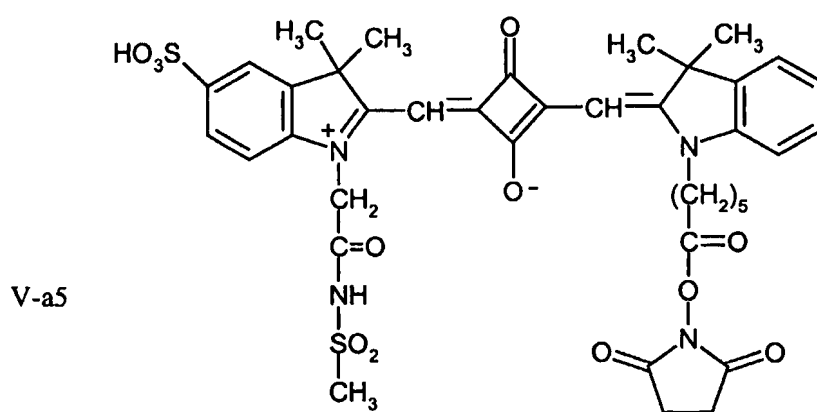
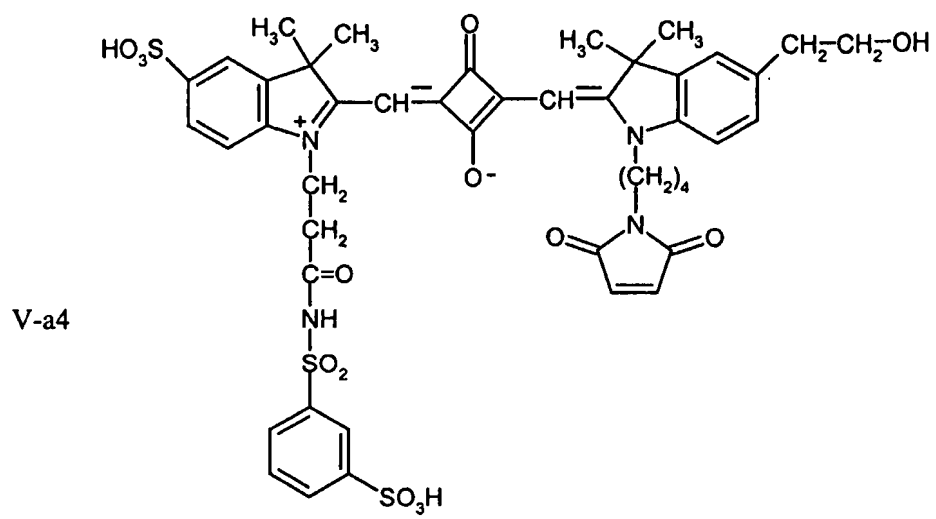
V-a2



V-a3

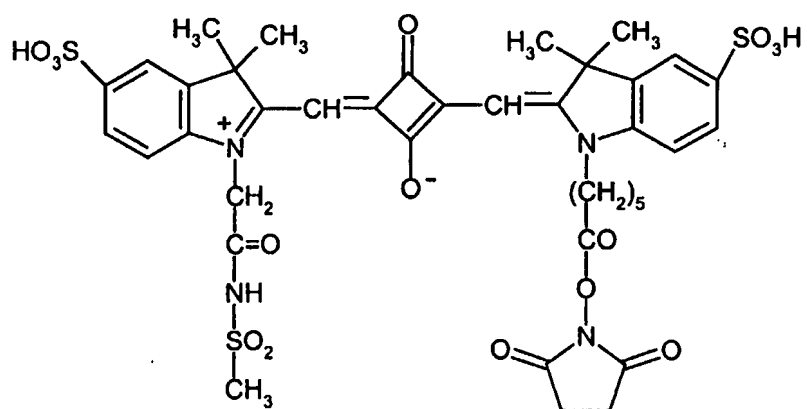


- 55 -

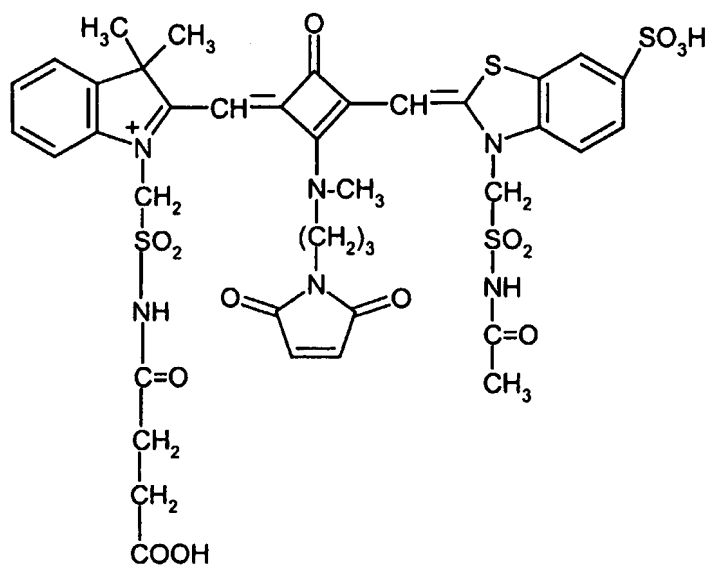


- 56 -

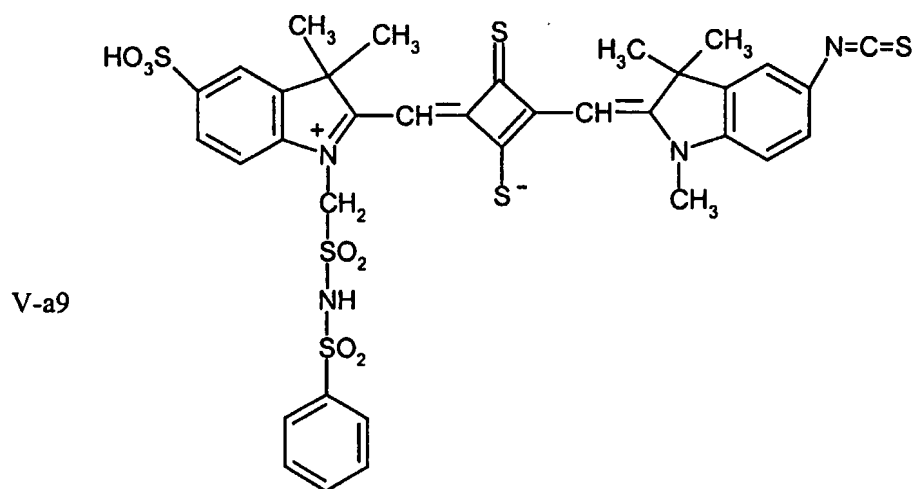
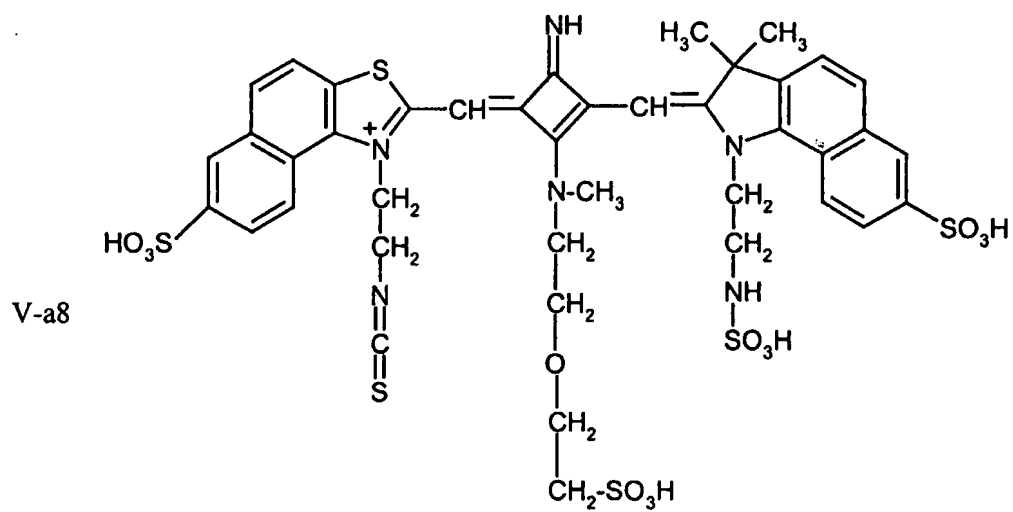
V-a6



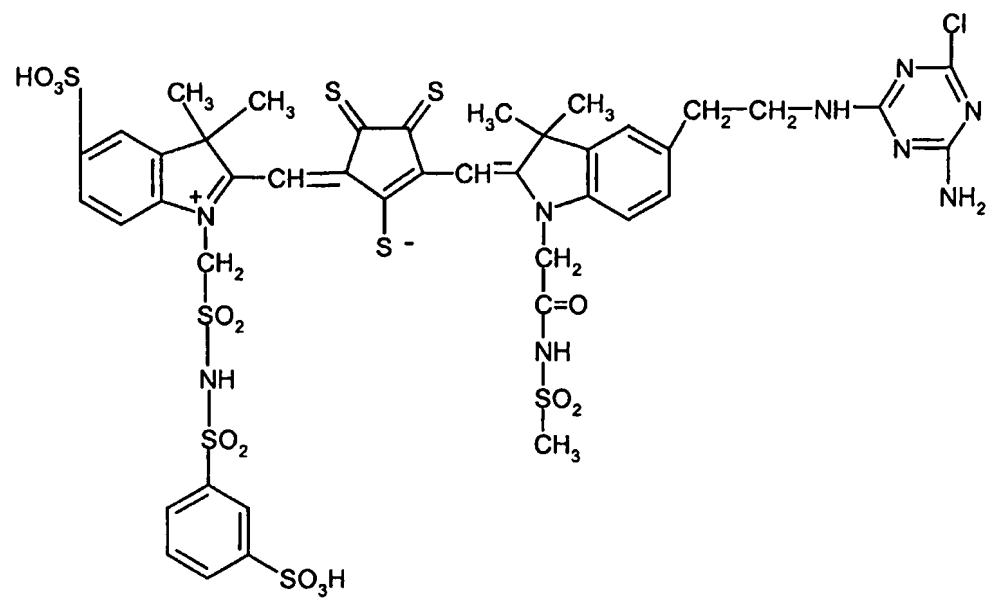
V-a7



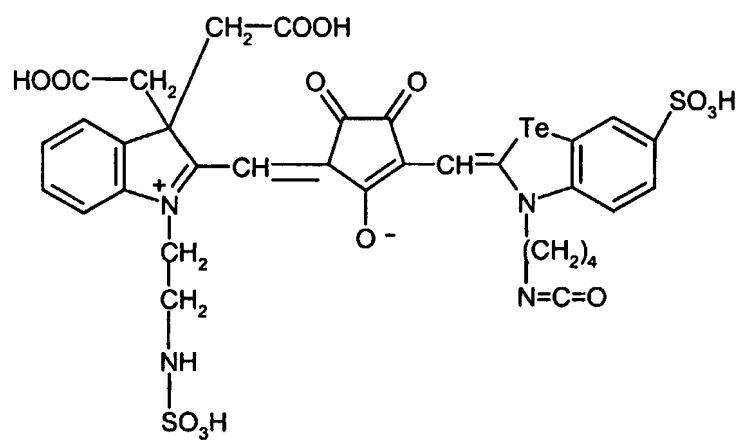
- 57 -



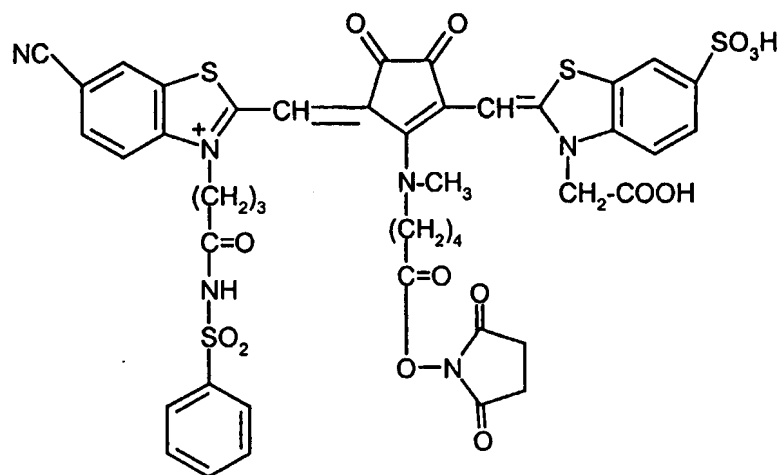
V-a10



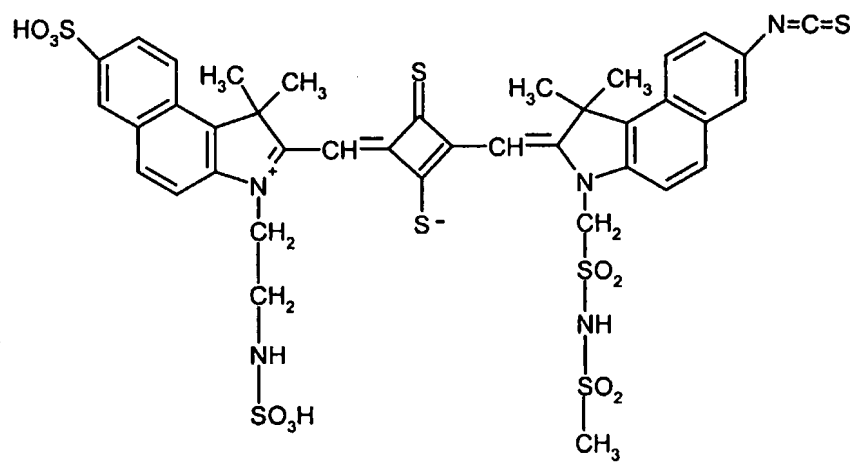
V-a11



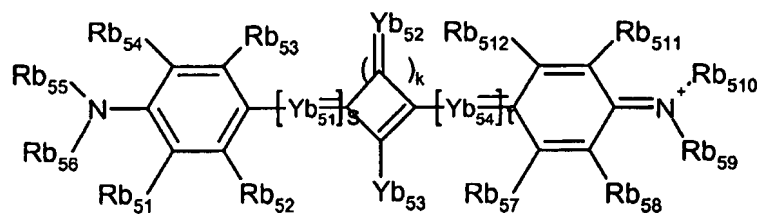
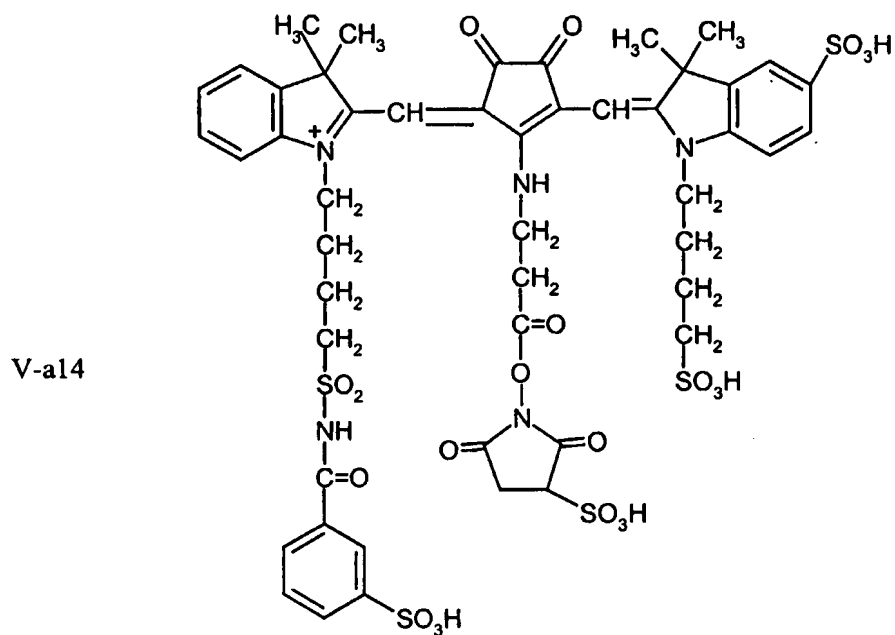
V-a12



Va-13



- 60 -



Formel 5-b

in der

5

Rb₅₁ bis Rb₅₁₂

unabhängig voneinander für einen beliebigen Substituenten stehen können

Yb₅₁ bis Yb₅₄

10

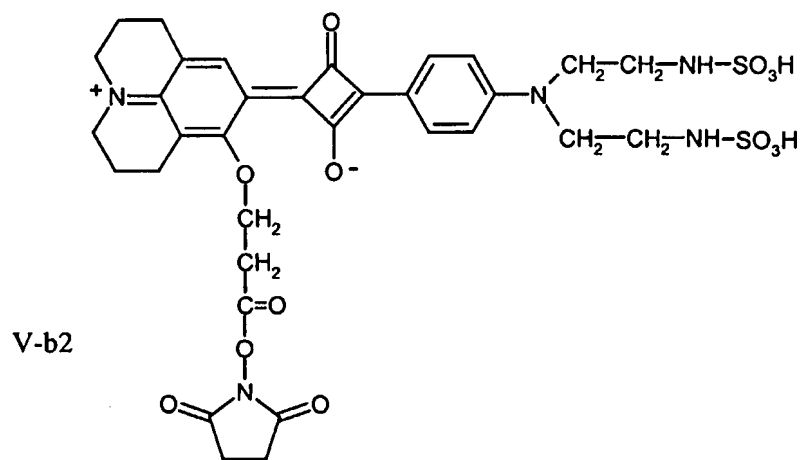
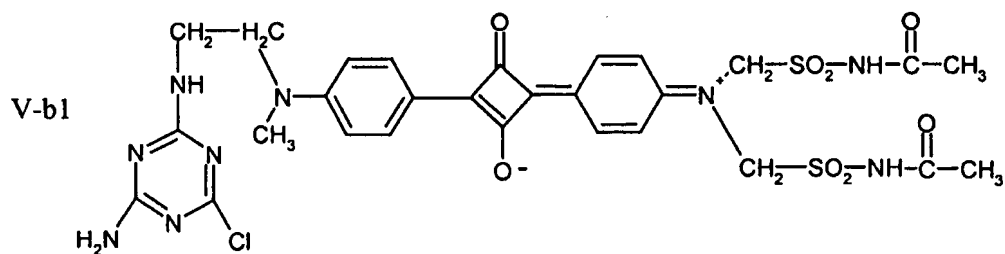
unabhängig voneinander für substituiertes oder unsubstituiertes C bzw. N, wobei die Substituenten auch einen 5- oder 6-gliedrigen, aliphatischen oder aromatischen Carbo- oder Heterocyclus bilden können.

- 61 -

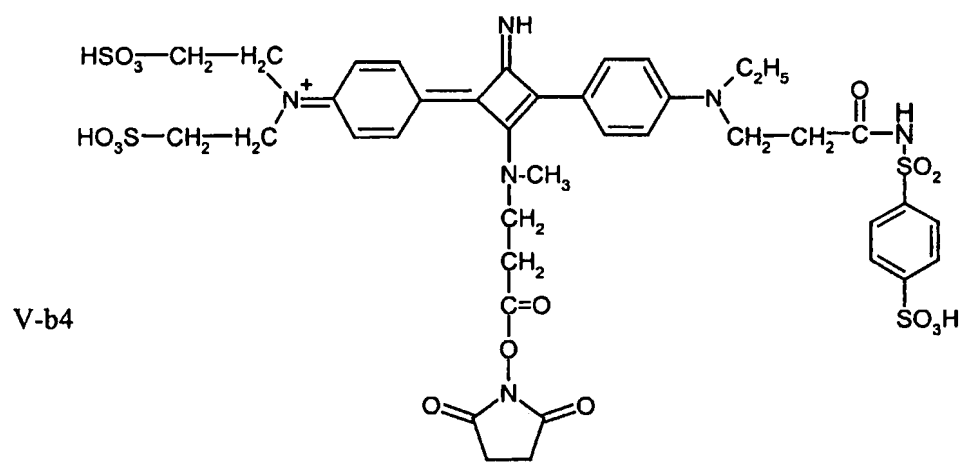
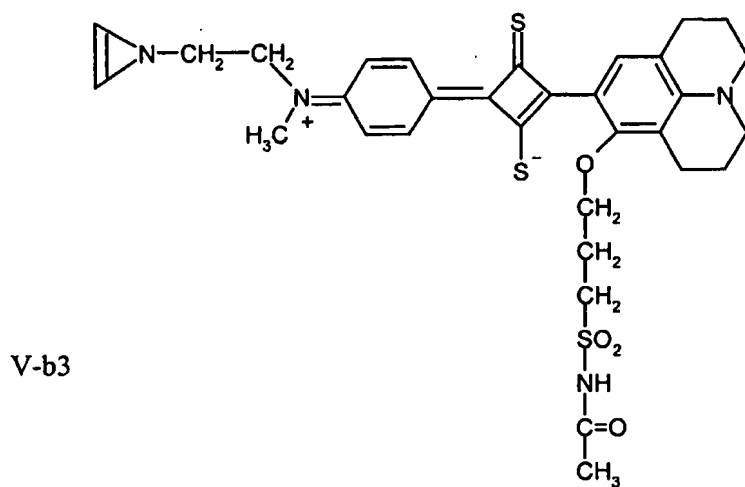
- s und t unabhängig voneinander für 0,1,2 oder 3 stehen,
- k für 1 oder 2 steht,
- 5 Yb₅₂ für O,S, oder =NRb₅₁₃,
- Yb₅₃ für O-Rb₅₁₄, S-Rb₅₁₅ oder N(Rb₅₁₆)(Rb₅₁₇),
- 10 wobei Rb₅₁₃ bis Rb₅₁₇ unabhängig voneinander für einen beliebigen Substituenten stehen können,
- mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Substituenten Rb₅₁ bis Rb₅₁₇ ausgewählt ist aus der Gruppe, die gebildet wird durch -(CH₂)_l-SO₂-Z-SO₂-R,
- 15 -(CH₂)_l-CO-Z-SO₂-R, -(CH₂)_l-SO₂-Z-CO-R, und -(CH₂)_l-N(R)-SO₃⁻,
- wobei
- l für eine Zahl zwischen 1 und 6,
- 20 Z für NH oder N⁻ steht und
- R bevorzugt für gegebenenfalls substituiertes Alkyl oder Aryl steht.
- 25 In einer bevorzugten Ausführungsform können folgende Substituenten einen 5-oder 6-gliedrigen Carbo- oder Heterocyclus bilden, der gegebenenfalls auch annelliert ist: Der Substituent Rb₅₅ zusammen mit Rb₅₆ und/oder Rb₅₅ mit Rb₅₄, und/oder Rb₅₆ mit Rb₅₁, und/oder Rb₅₁ mit Rb₅₂ und/oder Rb₅₄ mit Rb₅₃.

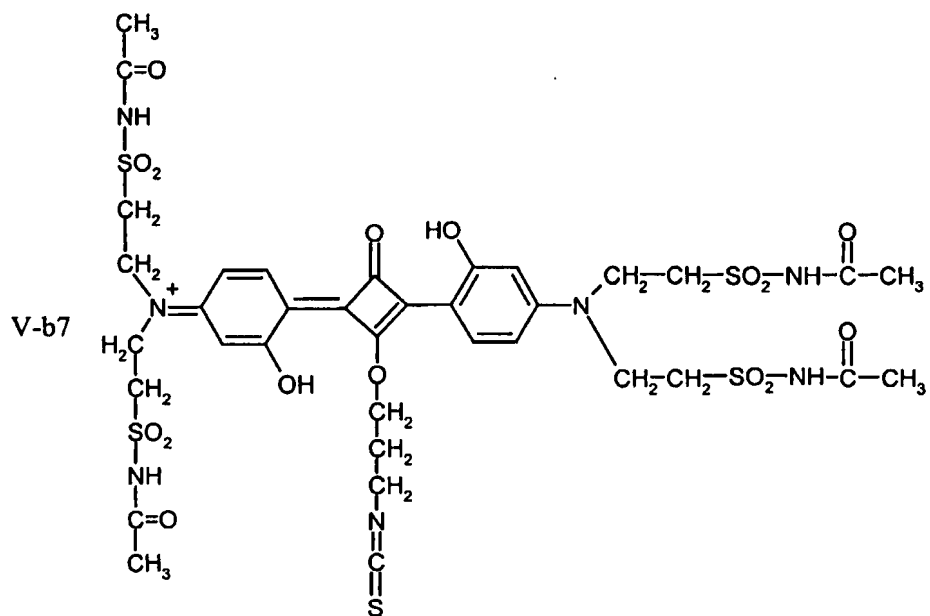
Der Substituent Rb₅₉ zusammen mit Rb₅₈ oder Rb₅₁₀ zusammen mit Rb₅₁₁, der Substituent Rb₅₁₁ zusammen mit Rb₅₁₂ und/oder der Substituent Rb₅₈ zusammen mit Rb₅₇.

Besonders bevorzugte Verbindungen der Formel 5b

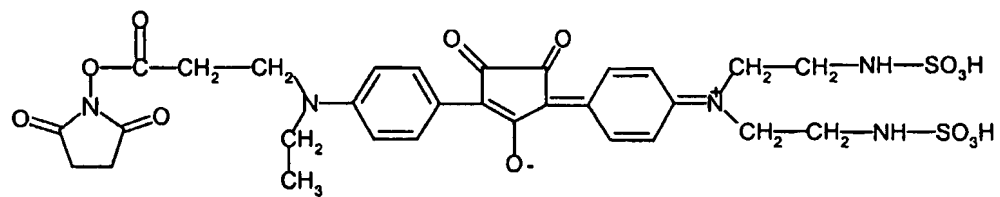


- 63 -

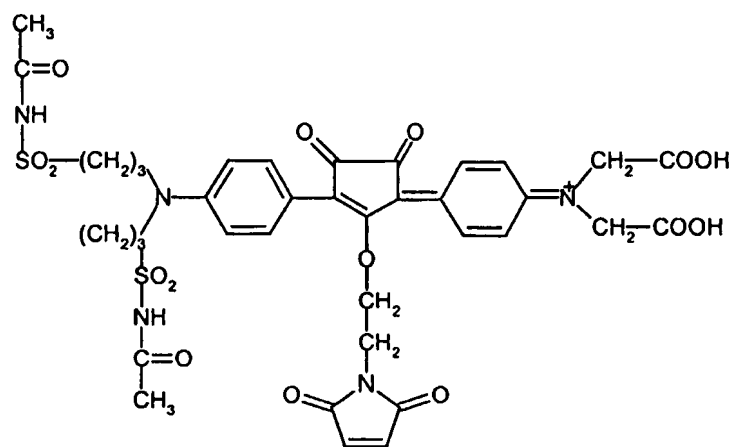




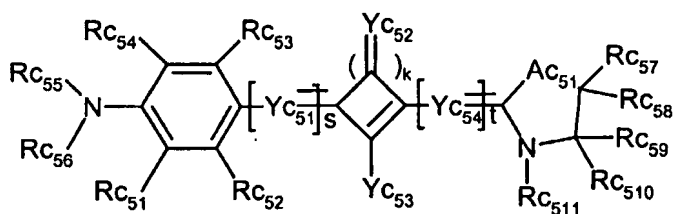
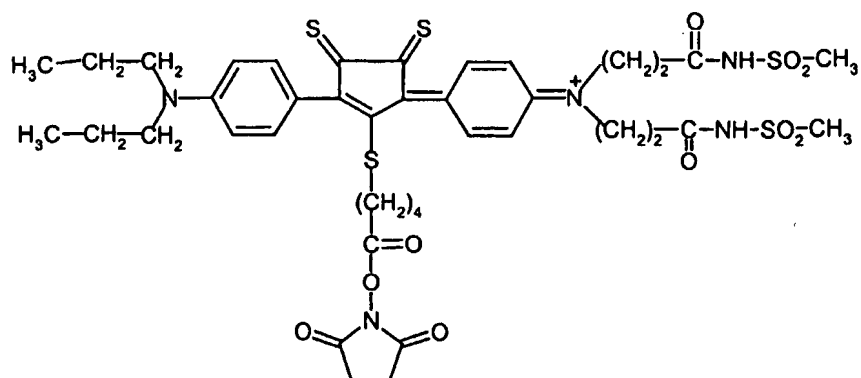
V-b8



V-b9



V-b10



Formel 5-c

5 in der

R_{C51} bis R_{C511} unabhängig voneinander für einen beliebigen Substituenten stehen können

10 Y_{C51} bis Y_{C54} unabhängig voneinander für substituiertes oder unsubstituiertes C bzw. N, wobei die Substituenten auch einen 5- oder 6-gliedrigen, aliphatischen oder aromatischen Carbo- oder Heterocyclus bilden können.

15 s und t unabhängig voneinander für 0, 1, 2 oder 3 stehen,

k für 1 oder 2 steht,

Y_{C52} für O, S, oder $=NR_{C512}$,

Y_{C53} für O- R_{C513} , S- R_{C514} oder N(R_{C515})(R_{C516}),

5

Ac_{51} für O, S, Se, Te, N- R_{C517} , C(R_{C518})(R_{C519}) oder
-C(R_{C520})=C(R_{C521})-, steht, wobei R_{C512} bis R_{C521} für einen
beliebigen Substituenten, vorzugsweise für H, gegebenenfalls
substituiertes Alkyl, Aryl oder Alkenyl, mit bis zu 20
10 C-Atomen stehen können,

mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Substituenten R_{C51} bis R_{C521} ausgewählt
ist aus der Gruppe, die gebildet wird durch $-(CH_2)_l-SO_2-Z-SO_2-R$,
 $-(CH_2)_l-CO-Z-SO_2-R$, $-(CH_2)_l-SO_2-Z-CO-R$, und $-(CH_2)_l-N(R)-SO_3^-$,

15

wobei

l für eine Zahl zwischen 1 und 6,

20

Z für NH oder N^- steht und

R bevorzugt für gegebenenfalls substituiertes Alkyl oder Aryl steht.

25

In einer bevorzugten Ausführungsform können folgende Substituenten einen 5-oder
6gliedrigen Carbo- oder Heterocyclus bilden, der gegebenenfalls auch annelliert ist:

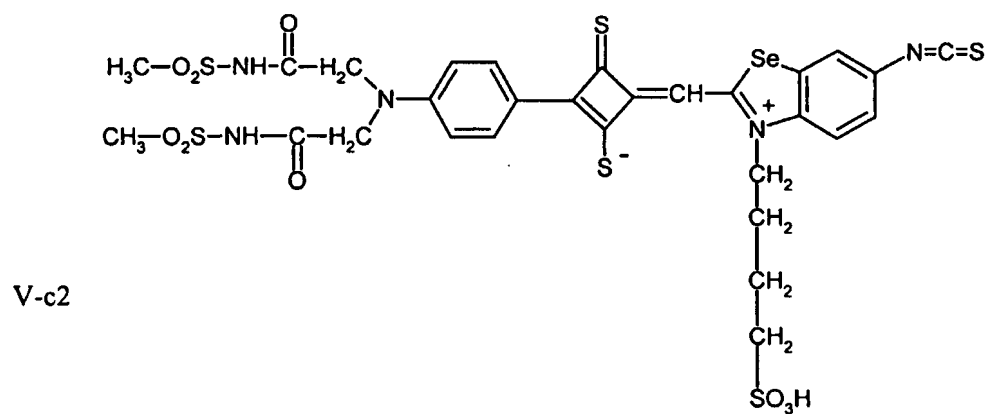
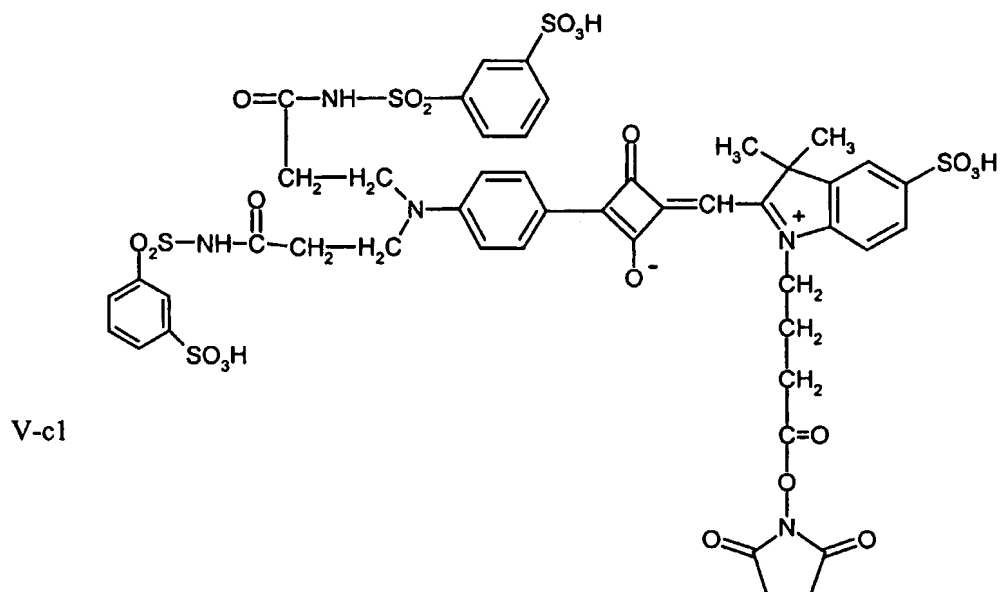
Der Substituent R_{C55} zusammen mit R_{C56} und/oder R_{C55} mit R_{C54} , und/oder R_{C56}
mit R_{C51} , und/oder R_{C51} mit R_{C52} und/oder R_{C54} mit R_{C53} .

30

Die Substituenten R_{C57} bis R_{C510} bilden vorzugsweise die restlichen Glieder eines
carbo-bzw. heterocyclischen Ringsystems, das bis zu 4 Ringen enthalten kann, die

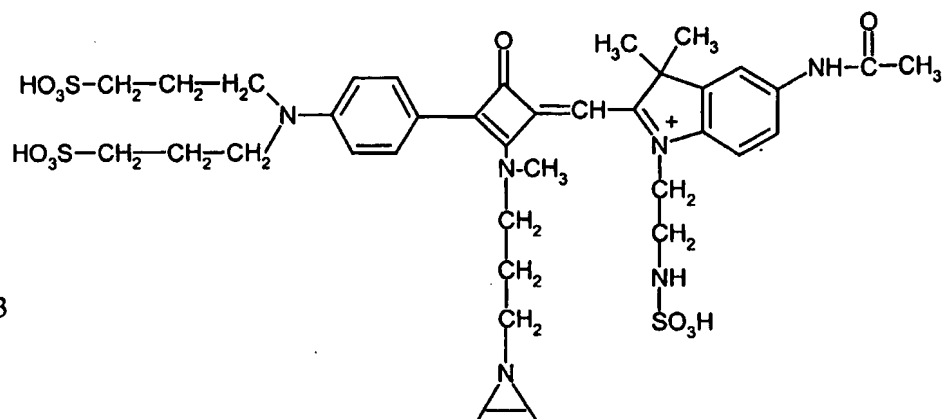
gegebenenfalls mehrere Substituenten tragen können. R_{C58} kann zusammen mit R_{C59} eine π -Bindung bilden und R_{C57} und R_{C510} können Substituenten darstellen.

Besonders bevorzugte Verbindungen der Formel 5c

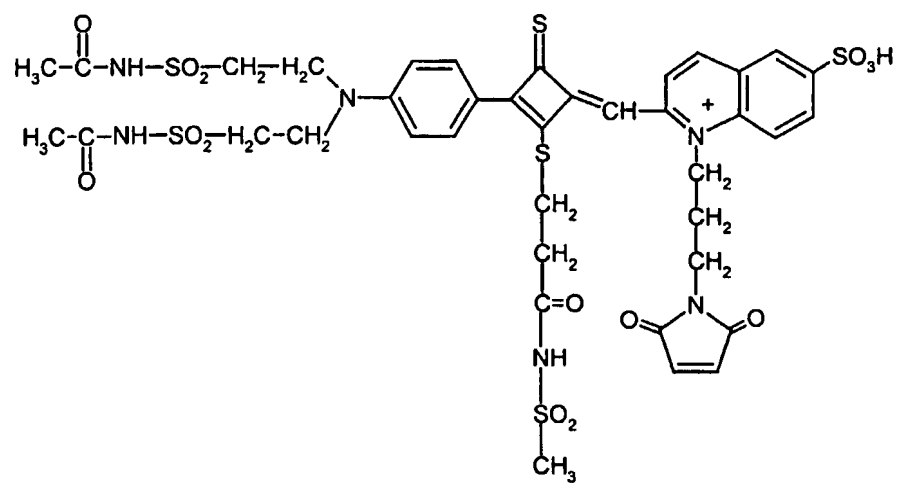


- 69 -

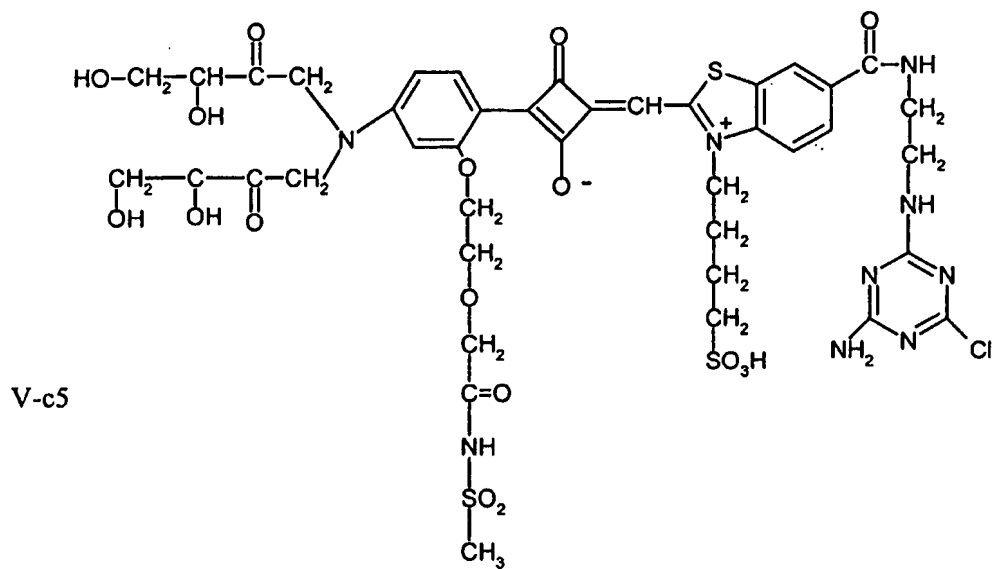
V-c3



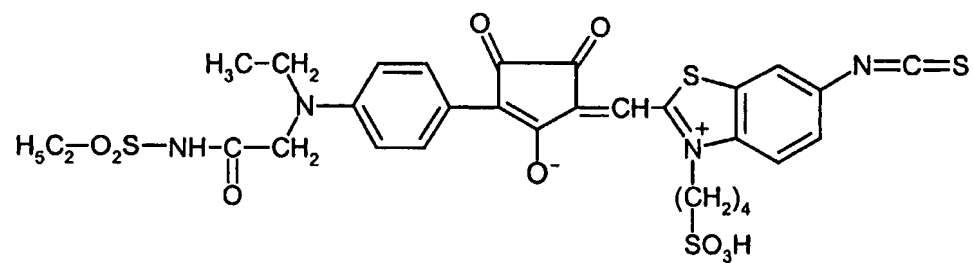
V-c4



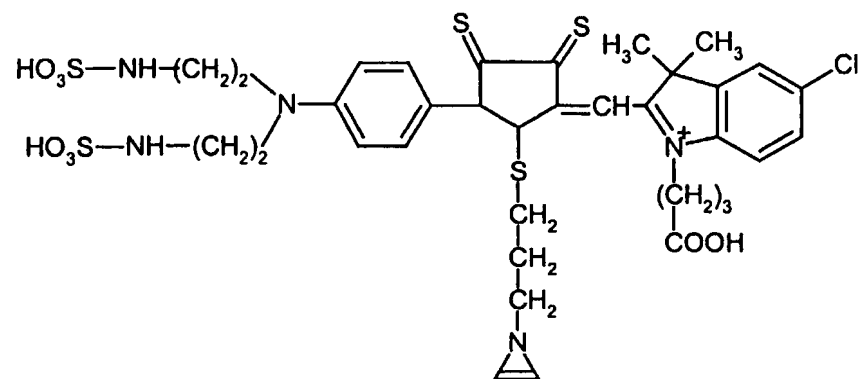
- 70 -



V-c6



V-C7



Substituenten im Sinne der vorliegenden Anmeldung sind beispielsweise Halogene, wie insbesondere F, Cl oder Br zu verstehen, desweiteren Alkoxy-, Alkylthio-, Aryloxy-, Arylthio-, Acylamino-, Alkylsulfonamido-, Alkylsulfamoyl-, Alkylcarbamoyl-, Arylsulfonamido-, Arylsulfamoyl-, Arylcarbamoyl-, Alkyl-, Alkenyl-, Aryl-, Hetaryl-, Arylen-, Hetarylen-, Alkylen-, Alkoxycarbonyl-, Ureido- oder Cyan-
5 gruppen. Weiterhin bevorzugt sind substituierte sowie nicht substituierte Cycloalkyl-, und auch substituierte sowie nicht substituierte Aryl-, insbesondere Phenylgruppen besonders bevorzugte Substituenten sind gegebenenfalls substituiertes Alkyl, Aryl, Sulfoalkyl, Carboxyalkyl, $-(CH_2)_l-SO_2-Z-SO_2-R$, $-(CH_2)_l-CO-Z-SO_2-R$,
10 $-(CH_2)_l-SO_2-Z-CO-R$, $-(CH_2)_l-N(R)-SO_3^-$ wobei l für eine Zahl zwischen 1 und 6 und Z für NH oder N⁺ steht und R bevorzugt für gegebenenfalls substituiertes Alkyl oder Aryl steht.

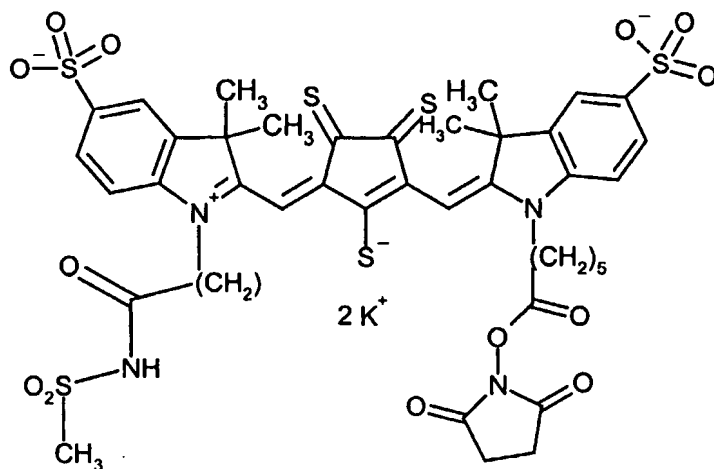
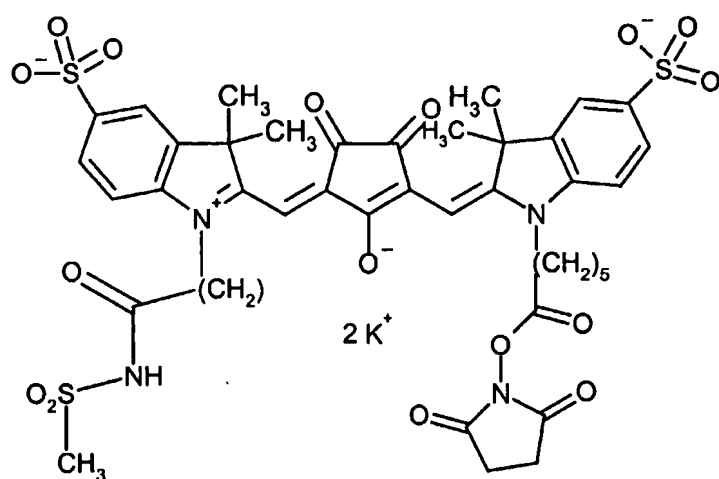
Unter Alkenyl im Sinne der vorliegenden Erfindung sind lineare oder verzweigte,
15 cyclische oder geradkettige, substituierte oder nicht substituierte ungesättigte Kohlenwasserstoffreste zu verstehen wie beispielsweise Ethenyl, 2-Propenyl, Isopropenyl.

Unter carbo- bzw. heterocyclischen Ringsystemen sind im Sinne der vorliegenden Anmeldung sind Ringsysteme bestehend aus vorzugsweise 4,5,6,7 oder 8 Kohlenstoffatomen, wobei bis zu 3 Kohlenstoffatome durch Heteroatome wie insbesondere
20 N, O, SE, oder S ersetzt sein können. Es kann sich bei den Ringsystemen um aliphatische oder aromatische Ringe handeln, vorzugsweise können 2, 3 oder 4 gleiche oder verschiedene Ringe auch als kondensiertes System vorliegen. Unter carbocyclischen aromatischen Gruppen im Sinn der vorliegenden Anmeldung sind vorzugsweise 5- oder 6-gliedrige kondensierte und/oder substituierte Ringsysteme insbesondere Phenyl- und Naphthyl zu verstehen. Unter ungesättigten heterocyclischen Gruppen sind vorzugsweise 5- oder 6-gliedrige Ringsysteme, welche monocyclisch aber auch als kondensierte Ringsysteme vorliegen können, zu verstehen. Als Heteroatome kommen dabei insbesondere N, S und O in Frage. Ein Ringsystem kann vorzugsweise zwischen 1 und 3 Heteroatome aufweisen, wobei es sich um die gleichen
30 oder verschiedene Heteroatome handeln kann. Bevorzugt sind: Furyl, Indolyl,

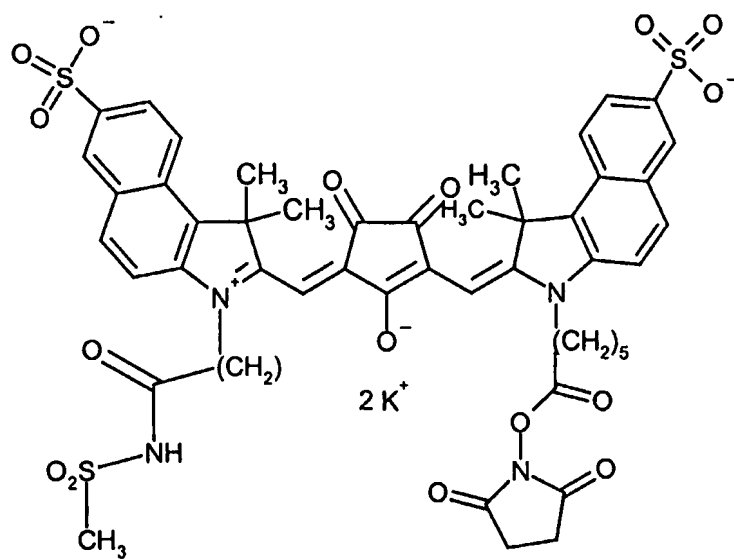
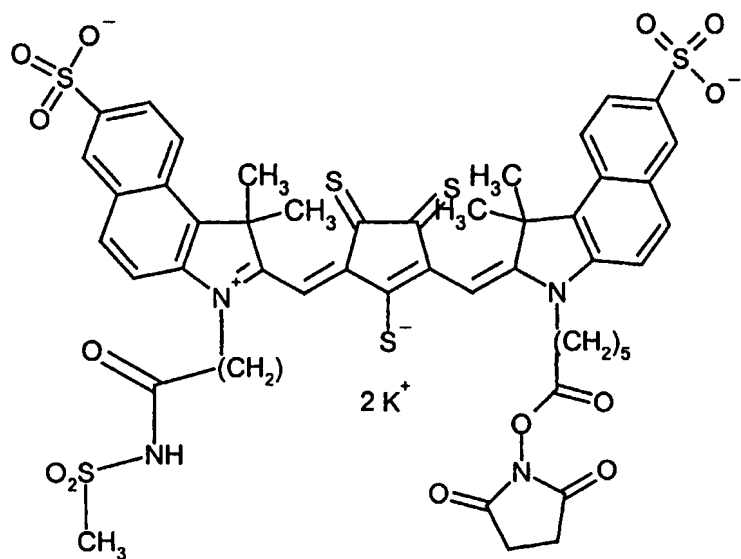
Thienyl, Pyrrolyl und Carbazolyl. Diese Gruppen können unsubstituiert oder vorzugsweise substituiert sein. Dabei können auch carbocyclische aromatische Gruppen und ungesättigte heterocyclische Gruppen selber als Substituenten auftreten, darunter soll auch die mögliche Kondensation verschiedener Ringsysteme verstanden werden.

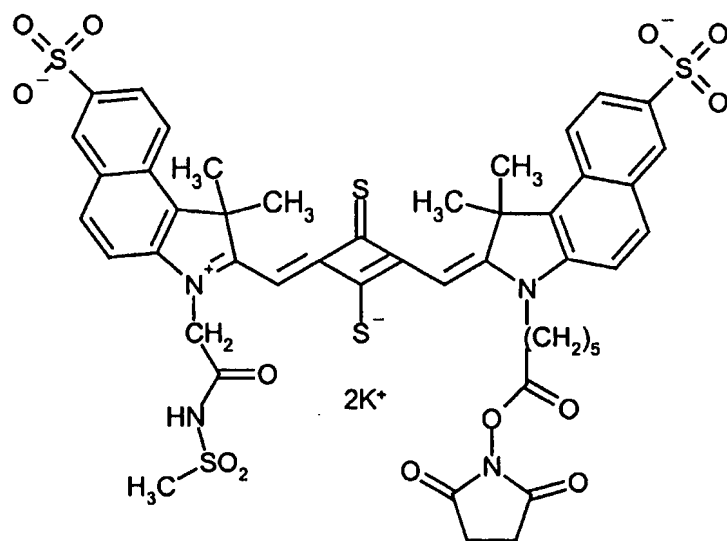
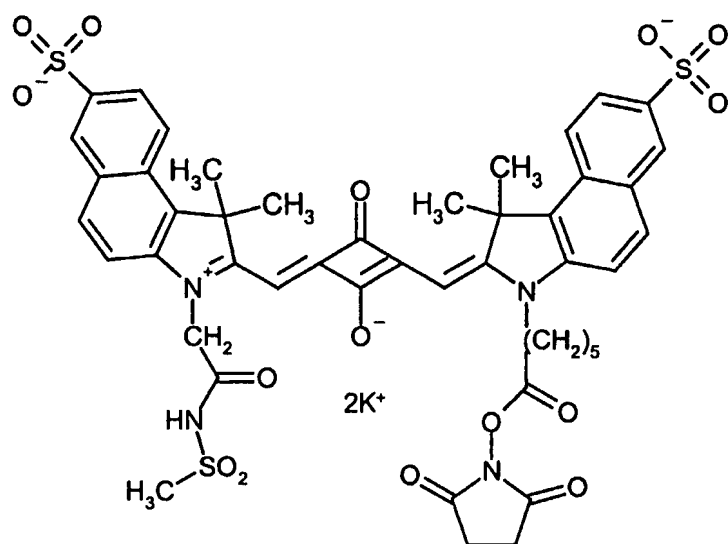
5

Erfindungsgemäß insbesondere bevorzugte Verbindungen einer der Formeln 1 bis 5 sind im folgenden aufgeführt:

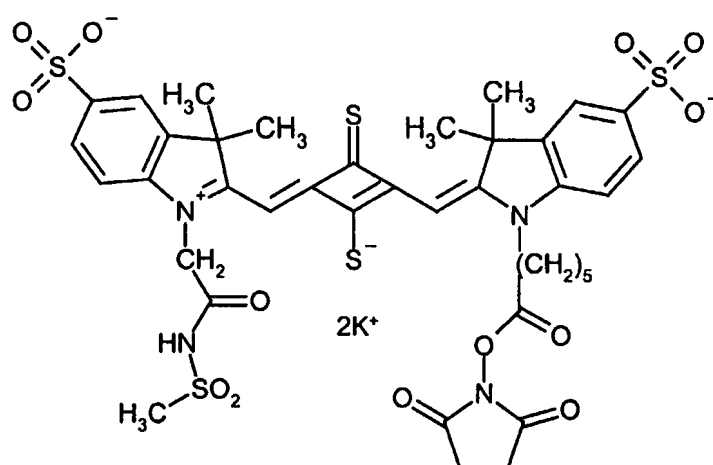
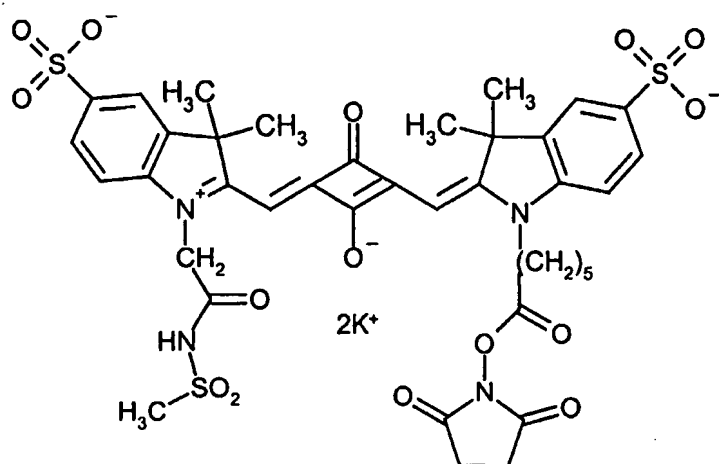


- 73 -

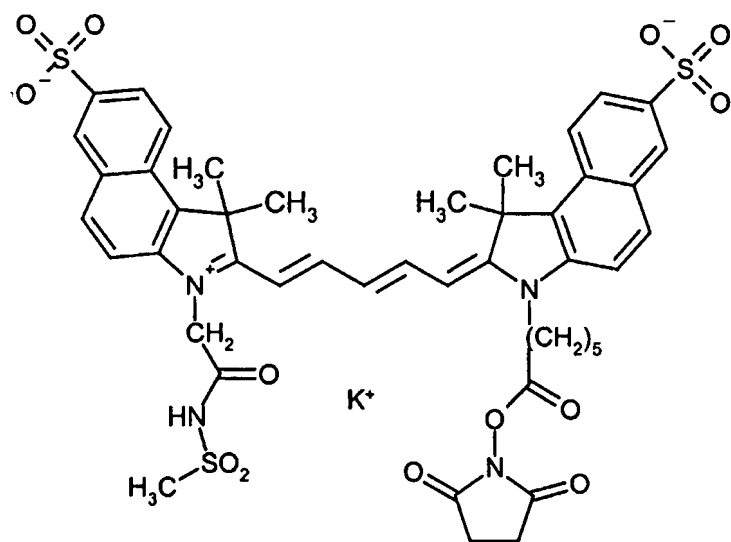
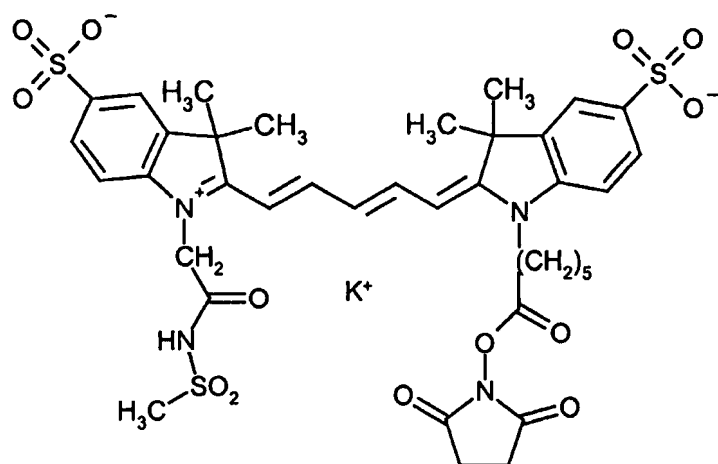




- 75 -



- 76 -



Erfindungsgemäß können die Farbstoffe auch an Antikörper konjugiert werden und z.B. in der Flow Cytometrie eingesetzt werden. Ein Vorteil dieser Polymethinfarbstoffe besteht darin, dass für nahezu jede Wellenlänge zwischen 500 und 900 nm ein Farbstoff maßgeschneidert werden kann. Dies führt dazu, dass auch Mehrfarbende-

5 tektion möglich ist. In der Flow Cytometrie können z.B. verschiedene Antikörper mit jeweils einem Fluoreszenzfarbstoff gelabelt werden und dann in einem Experiment mit einem geeigneten Detektionssystem simultan detektiert werden. Die spezifischen Antikörper erkennen dann verschiedene Epitope auf den Zellen. Eine Quantifizierung der Analyte ist mit diesen Systemen ebenfalls möglich. Der Einsatz mehrerer

10 fluoreszenzgelabelter Antikörper liefert so einen höheren Informationsgehalt pro Experiment. Dies bedeutet einen Kostenvorteil, insbesondere z.B. für klinische Tests.

Desweiteren können mittels Labeling von miteinander wechselwirkenden Biomolek-
15 kulen durch Fluoreszenzresonanzenergietransfer auch qualitative bzw. quantitative Nachweisverfahren durchgeführt werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung der Farbstoffe zum Labeln von DNA, RNA oder Nukleotidanaloga wie PNA und können hier für Nukleinsäureassays eingesetzt werden können. Üblicherweise werden hier

20 aktivierte Farbstoffmoleküle an Nukleotide, Nukleoside, Nukleotidanaloga oder Oligonukleotide bzw. deren Analoga gebunden. Die Bindung erfolgt über eine nukleophile Gruppe der Nukleotide bzw. Analoga, welche mit dem aktivierten Farbstoff reagiert. Übliche nukleophile Gruppen sind Aminogruppen, Thiolgruppen, Hydroxylgruppen oder andere Gruppen. Die aktivierten Gruppen sind in der Regel

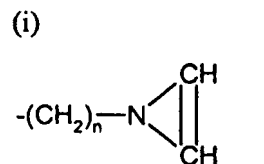
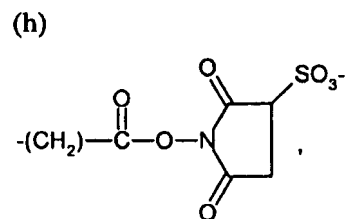
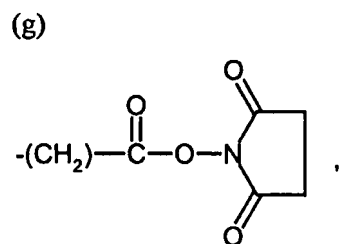
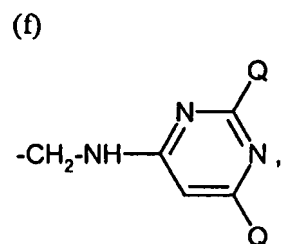
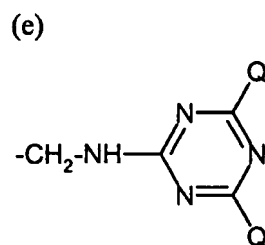
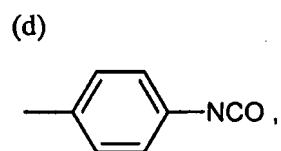
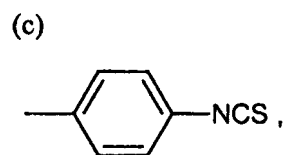
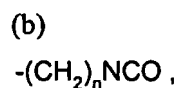
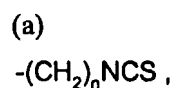
25 Derivate von Carboxylgruppen, wie N-Hydroxysuccinimidester, Isothiocyanate, Maleimide oder Iodacetamidderivate. Außerdem kann eine nukleophile Gruppe auch mit einem Phosphoamiditrest reagieren und so eine kovalente Bindung zwischen dem Farbstoffmolekül und dem Biomolekül entstehen.

30 Als weitere Anwendung können die Farbstoffe auch an feste Phasen, wie z.B. polymere Beads gebunden werden oder in diese eingelagert werden. Die polymeren

Beads können funktionalisiert werden und ihrerseits als Fluoreszenzlabel in der Bioanalytik fungieren.

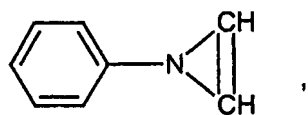
Wie bereits beschrieben sind Polymethinfarbstoffe enthaltend eine Gruppe der Formel (I) bereits aus der Fotografie bekannt, sie sind erhältlich wie beispielsweise in EP 0 534 283, EP 0 530 511, DE 1 081 311 beschrieben.

Demgegenüber sind Polymethinfarbstoffe enthaltend eine Gruppe der Formel (I) und gleichzeitig eine Gruppe die sie befähigt kovalente Bindungen auszubilden, ausgewählt aus der Gruppe der folgenden Verbindungen:

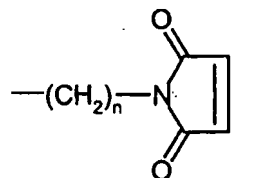


- 79 -

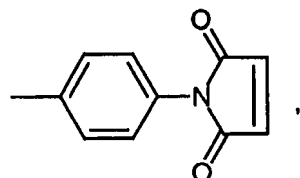
(j)



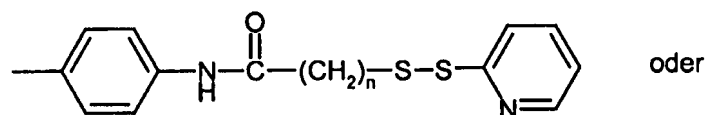
(k)



(l)

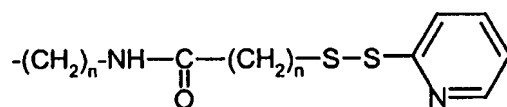


(m)



oder

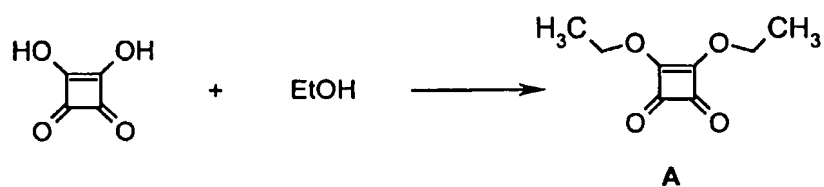
(n)



neu und im Stand der Technik noch nicht beschrieben. Im folgenden sind daher Synthesevorschriften aufgezeigt, wie derartig „aktivierte“ Farbstoffe erhalten werden können:

5 Synthesevorschriften für die Herstellung von erfindungsgemäßen Farbstoffen **F** und **J**

1. Synthese von **F**



- 80 -

A

0,15 mol 3,4-Dihydroxy-3-cyclobuten-1,2-dion wird 12 h in 150 mL absolutem Ethanol unter Rückfluss erhitzt.

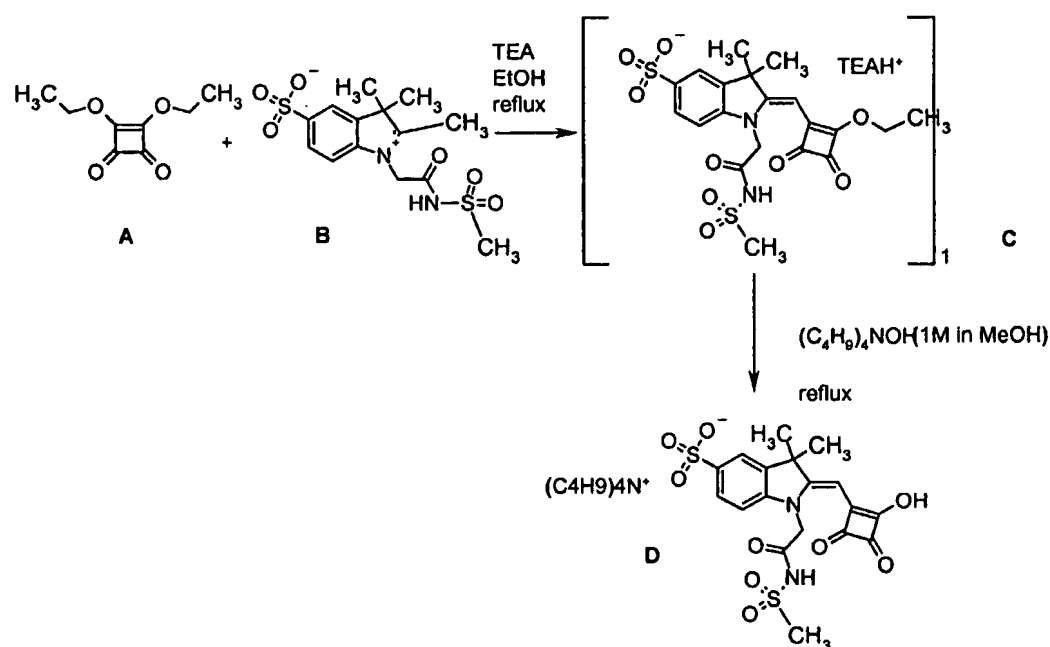
Das Reaktionsgemisch wird eingedampft.

5 Die Reinigung des Öls erfolgt durch Säulenchromatografie.

Eluent: Methyl-tert.-butylether/iso-Octan 50:50

Stationäre Phase: AMICON 35-70 mic.

Ausbeute: 48%



10

C

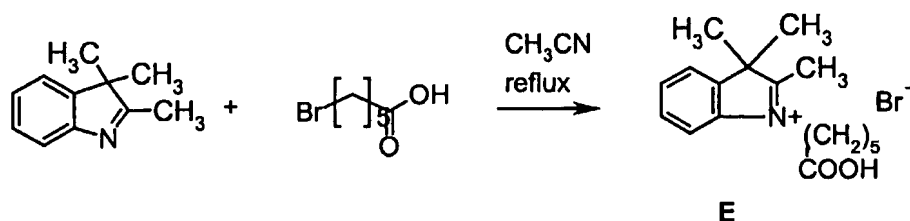
0,055 mol A, 0,0068 mol B und 0,0078 mol Triethylamin werden in 50 mL absolutem Ethanol am Rückfluss gekocht. Nach 35 min. wird 0,107 mol Triethylamin zugegeben. Nach 3,5 h kühlt man ab. Man gibt Ethylacetat zu und dekantiert nach kräftigem Rühren. Diese Verfahrensschritte werden noch 3mal wiederholt. Man gewinnt ein Öl (C).

15

Hydrolyse zu D

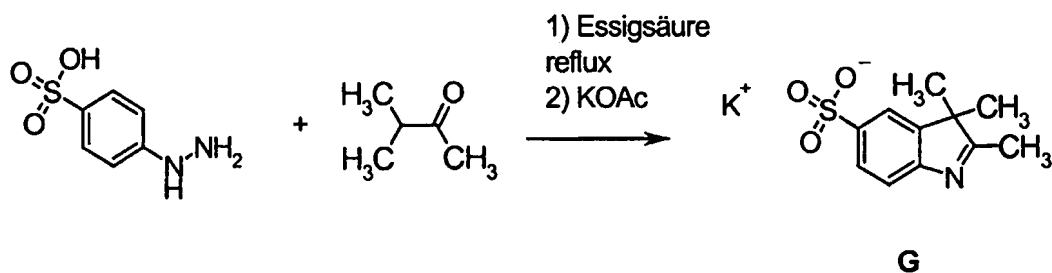
Das Öl C wird in 0,145 mol $(C_4H_9)_4NOH$ (1 M in Methanol) unter Rückfluss erhitzt. Nach 30 min kühlt man ab. 500 mL Aceton und 16 mL konzentriertes HCl werden zugegeben. Man filtriert den ausgefallenen Feststoff ab.

5 Ausbeute: 28 g

**E**

10 0,63 mol 2,3,3-Trimethylindolenin und 0,5 mol $Br(CH_2)_5COOH$ werden 3 h in einer geringen Menge Acetonitril unter Rückfluss erhitzt. Die Temperatur des Reaktionsgemisches beträgt 130°C. Man gibt 0,5 mol Essigsäure zu und kühlt auf 100°C ab. Anschließend gibt man 250 mL Methylethylketon zu und kühlt weiter im Eisbad auf 15°C ab. Man filtriert den ausgefallenen Feststoff ab und trocknet bei 50°C.

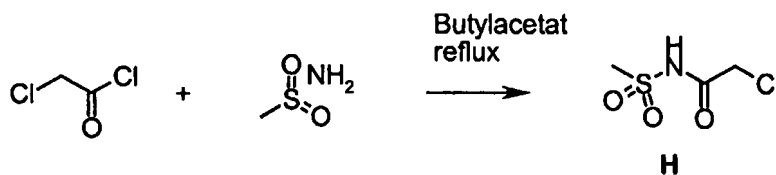
15 Ausbeute: 75%

**G**

20 3,5 mol Phenylhydrazin-4-sulfonsäure und 1,9 L Essigsäure werden auf 105°C erhitzt. Im Verlauf von 30 min tropft man 4,8 mol 3-Methyl-2-butanon zu. Nach 1 h 50 min entfernt man die Heizquelle und gibt man 4,2 mol Kaliumacetat in 3,5 L

Methanol zu. Man kühlt weiter im Eisbad ab und filtriert den ausgefallenen Feststoff ab. Mit Ethylacetat wird nachgewaschen.

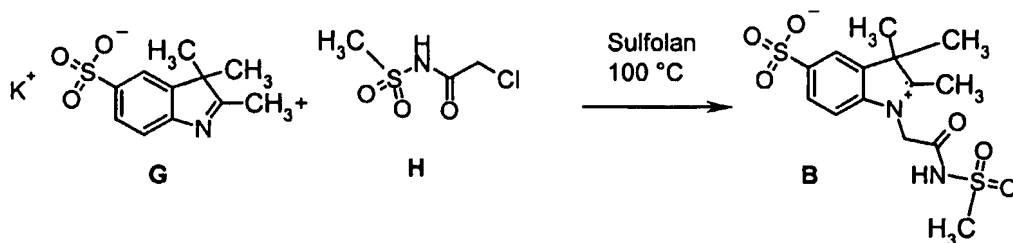
Ausbeute: 77%



H

26,8 mol Chloroacetylchlorid und 25,5 mol Methansulfonamid werden in 10,2 L Butylacetat langsam am Rückfluss gekocht. Nach 8 h kühlt man auf 20°C ab. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert und in 4 L Butylacetat gerührt. Der ausgefallene Feststoff wird bei 50°C im Umlufttrockenschrank getrocknet.

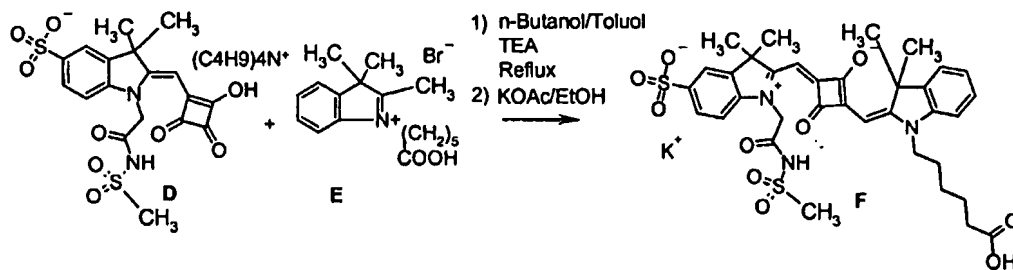
Ausbeute: 74%



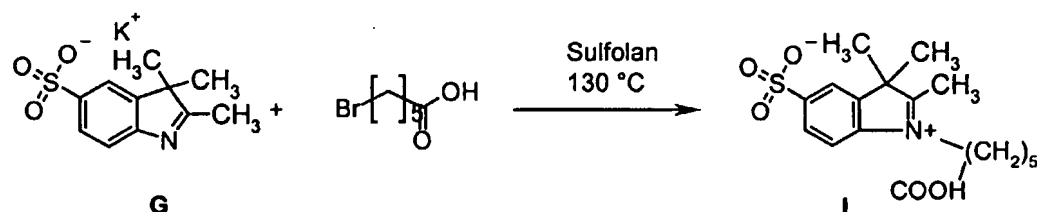
B

2,5 mol **G** und 2,5 mol **H** werden in 1,3 L Sulfolan auf 130°C erwärmt. Nach 5 h und 50 min kühlt man auf 50°C ab. Man gibt 2,5 L Aceton zu und kühlt weiter bis auf Raumtemperatur. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert und mit Aceton nachgewaschen. Man rührt den ausgefallenen Feststoff in 1,6 L warmem entmineralisiertem Wasser. Man gibt 1,6 L Ethanol zu und kühlt ab. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert und mit Ethanol nachgewaschen.

Ausbeute: 53%

**F**

In einem Kolben mit Dean-Stark-Abscheider werden 4,7 g D, 3,5 g E und 1,4 mL Triethylamin in n-Butanol/Toluol am Rückfluss gekocht. Nach 2,5 h kühlt man ab. Man extrahiert 3 mal mit Wasser. Das Reaktionsgemisch wird eingedampft und danach erneut in Ethanol gelöst. Man gibt 3 g Kaliumacetat zu und filtriert ab. Man nimmt den ausgefallenen Feststoff in Wasser auf und gibt Aceton zu. Man dekantiert und gibt erneut Aceton zu. Diese Verfahrensschritte werden wiederholt, bis Ausfällung auftritt. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert.

2. Synthese von J

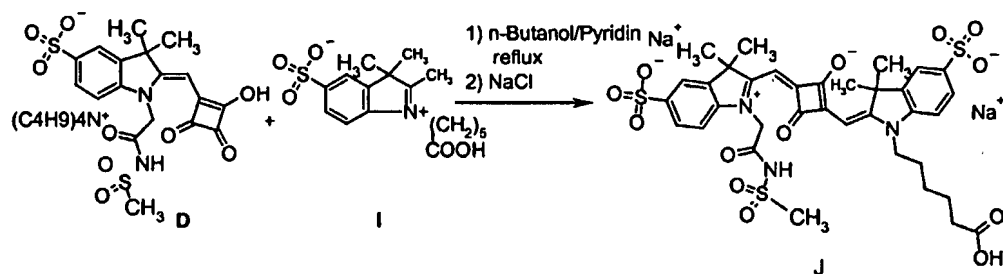
15

I

0,1 mol G und 0,12 mol Br(CH₂)₅COOH werden in 35 mL Sulfolan auf 130°C erwärmt. Nach 3 h gibt man 100 mL Dimethylacetamid zu und kühlt auf Raumtemperatur ab. Man filtriert den ausgefallenen Feststoff ab und wäscht auf dem Filter mit Dimethylacetamid nach. Man kocht den ausgefallenen Feststoff in Aceton. Nach dem Abkühlen filtriert man und trocknet im Umlufttrockenschrank bei 50 °C.

20

Ausbeute: 90%



J

4,7 g D und 3,5 g I werden 2 h und 10 min in 80 mL n-Butanol/Pyridin (7:1) am Rückfluss gekocht. Man kühlt auf Raumtemperatur ab und filtriert den ausgefallenen Feststoff ab. Auf dem Filter wird mit n-Butanol bzw. Aceton nachgewaschen. Man nimmt den ausgefallenen Feststoff in 7 mL entmineralisiertem Wasser auf und gibt unter Rühren 30 mL Acetonitril zu. Man dekantiert die flüssige Phase und gibt unter Rühren abermals Acetonitril zu. Man dekantiert die flüssige Phase und rührt das Öl mit 40 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung. Die feine Suspension wird zentrifugiert und die flüssige Phase dekantiert. Man löst den ausgefallenen Feststoff in Methanol und filtriert das Natriumchlorid ab. Das Filtrat wird eingedampft. Man trocknet bei 50°C

Ausbeute: 1,57 g (18,5%)

Allgemeine Vorschrift zur Herstellung von Succinimidylestern aus Polymethinfarbstoffen mit Carboxylfunktionen

- Die vorliegende Vorschrift beschreibt die Herstellung von Succinimidylestern aus Polymethinfarbstoffen mit mindestens einer Carboxylfunktion. Diese Ester können dann zum Labeln von Biomolekülen wie Proteinen, Antikörpern oder Nukleinsäuren benutzt werden.
- 0.05 mmol Farbstoff werden mit Disuccinimidylcarbonat (1.5 Äquivalente pro Carboxylgruppe) in 40mL DMF gelöst und eine Spatelspitze Dimethylaminopyridin

zugegeben. 3 Std. wird bei 40°C gerührt. Nach Abkühlen wird der Überstand in 1 ml Aliquots auf Glasvials verteilt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abgedampft und bis zur Verwendung im Dunkeln bei 4°C gelagert.

- 5 Das Rohprodukt wird direkt zum Labeln von Proteinen benutzt.

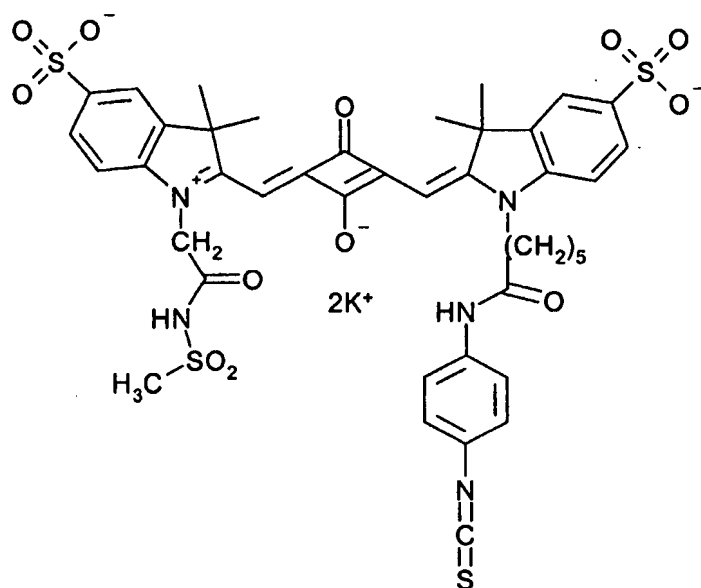
Allgemeine Vorschrift zum Labeln von Proteinen

- 10 Zum Labeln wird das Rohprodukt (1 Aliquot) in 1 ml DMF gelöst. 50 µl dieser Lösung werden zu 1,5 mL (=1mg) Anti-HSA- Lösung in 0.1 M Carbonatpuffer pH 9.2 pipettiert. Die Reaktionslösung wird 2 Stunden bei RT gerührt.

- 15 Anschließend trennt man das Konjugat vom ungebundenen Farbstoff mittels Gelpermeationschromatographie über eine Sephadex G50 Säule ab, die zuvor mit PBS, pH 7.4 equilibriert wurde.

Allgemeine Vorschrift zum Labeln von Oligonukleotiden mit Farbstoff

- 20 Die Farbstoffe können auch für das Markieren von DNA oder RNA-Nukleotiden oder Nukleotidanaloga eingesetzt werden.



Farbstoff K

- 50 mmol aktivierter Farbstoff, z.B. Isothiocyanat K werden in 50 ml DMF oder
 5 Acetonitril gelöst. 10 nmol NH₂-Oligonukleotid werden in 150 µl 50 mM Carbonat-
 puffer, pH 9.2 vorgelegt und langsam 75 nmol Farbstoff hinzupipettiert. Die Lösung
 wurde 3 bis 5 Std. bei 25°C gerührt unter Lichtausschluss.

Aufreinigung des Oligonukleotids

10

Die Reinigung des gelabelten Oligonukleotids von ungebundenem Farbstoff und un-
 gelabelter DNA erfolgte über RP-HPLC über eine C8-Säule. Es wurde mit einem
 linearen Gradienten, z.B. von 70 % Wasser bis 100 % Methanol über 30 min. eluiert.

- 15 Die Fraktionen, die bei 254 nm und dem Absorptionsmaximum des Farbstoffs
 gleichzeitig absorbieren wurden gesammelt und im Vacuum vom Lösungsmittel ent-
 fernt.

- 20 Zur weiteren Verwendung des modifizierten Oligonukleotids kann dieses noch durch
 Ethanolpräzipitation von überschüssigen Salzen getrennt werden.

Beispiele

Tabelle 1 zeigt die relativen Quantenausbeuten der Farbstoffe bei ähnlichen molaren Farbstoff/Protein-Verhältnissen. Als Protein wurde HSA (Human Serum Albumin) verwendet.

5

Farbstoff	D/P Ratio	rel. Q.Y.	Extinktionskoeffizient [mol ⁻¹ *cm ²]
Sq-1 (Bsp.)	0.36	0.64	172000
Sq-2 (Bsp.)	0.40	1.0	234000
F (Inv)	0.37	1.35	420000
J (Inv.)	0.46	1.36	240000

Tabelle 1

Bestimmung des molaren Farbstoff/Proteinkoeffizienten

- 10 Die Proteinkonzentration wird mittels der BCA-Methode von Pierce (Literatur: Bradford, M.M.; Anal. Biochem. (1976) 72, 248-254) bestimmt. Eine Eichkurve für anti-HSA wurde zuvor erstellt.

Die Farbstoffkonzentration wird über das Absorptionsspektrum bestimmt.

15

Bestimmung der Quantenausbeute

Die Bestimmung der Quantenausbeute erfolgt relativ zu Cy5

Bestimmung des Extinktionskoeffizienten

- 20 Der Extinktionskoeffizient wurde unter Annahme der Gültigkeit des Beer'schen Gesetzes bestimmt.

Labeln von aktiviertem Farbstoff F an Anti-HSA

Zum Labeln wird das Rohprodukt (1 Aliquot) in 1 ml DMF gelöst. 50 µl dieser Lösung werden zu 1,5 mL (=1mg) Anti-HSA- Lösung in Carbonatpuffer pH 9.2 pipettiert. Die Reaktionslösung wird 2 Stunden bei RT unter Lichtausschluss gerührt.

5

Anschließend trennt man das Konjugat vom ungebundenen Farbstoff mittels Gel-permeationschromatographie über eine Sephadex G25 Säule ab. Als Elutionspuffer wird PBS, pH 7.4 benutzt.

10 In analoger Weise wurden Proteinkonjugate von den anderen Farbstoffen, die in Tabelle 1 angegeben sind, hergestellt.

Tabelle 1 zeigt, dass die erfindungsgemäßen Farbstoffe höhere Quantenausbeuten und Extinktionskoeffizienten aufweisen als z.B. Cy5. Daher sind sie besonders
15 geeignet als Fluoreszenzmarker in der Bioanalytik.

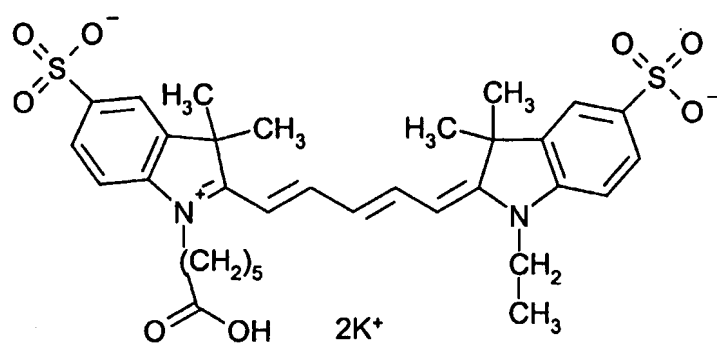
Die Farbstoffkonjugate der erfindungsgemäßen Farbstoffe zeigen geringere Aggregationsneigung als bisher übliche Polymethinfarbstoffe. Dies wird in Tabelle 2 deutlich.

20

Tabelle 2

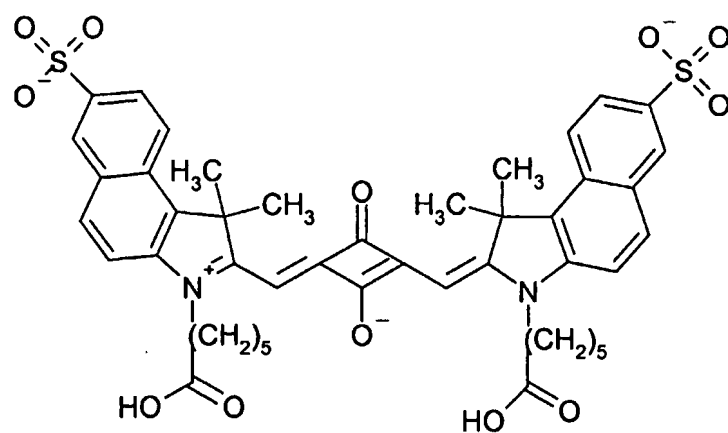
Absorption Monomer/Absorption Dimer			
	Wasser	2,0 M NaCl	3,8 M NaCl
CY5	3,12	3,18	3,19
Sq-3	2,98	2,14	1,78
Sq-1	4,65	4,48	3,40
Sq-2	2,96	2,98	1,36
F	2,89	2,81	2,81
J	4,40	4,35	4,40

- 89 -

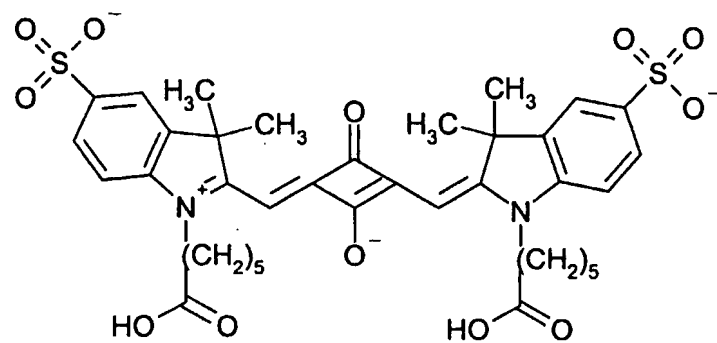


CY5

5

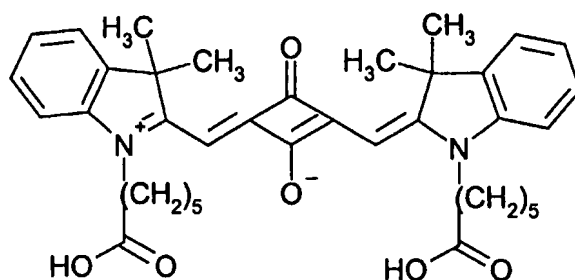


Sq-1



10

Sq-2



Sq-3

5 Die Intensität der Absorption im Absorptionsmaximum des Monomers ist ein relatives Maß für die Konzentration des Monomers in der Lösung. gleiches gilt für die Konzentration des Aggregates. diese kann mit der Intensität der Absorption im Absorptionsmaximum des Aggregates, welches hypsochrom gegenüber dem Monomer verschoben ist, korreliert werden.

10

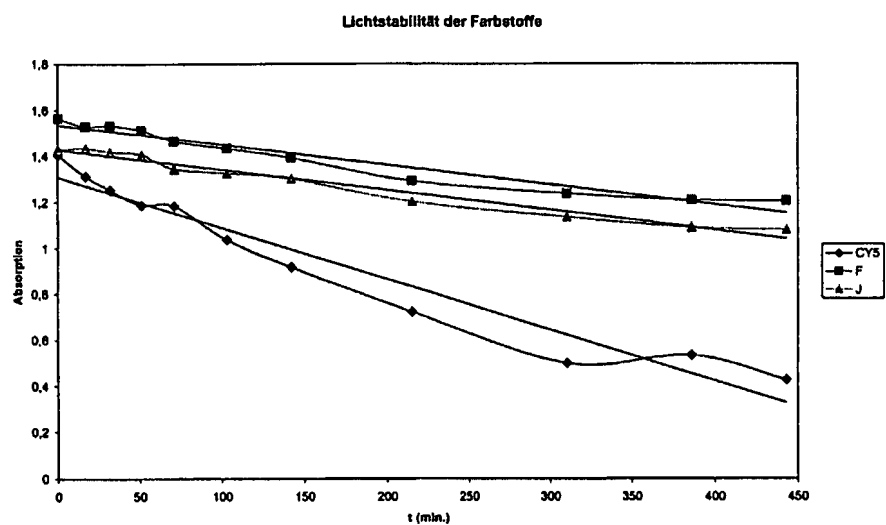
Tabelle 2 zeigt das Verhältnis der Intensitäten der Absorptionsmaxima des Monomers und Aggregates. Die steigende Salzkonzentration bewirkt eine Zunahme der Aggregatbildung. Der erfindungsgemäße Farbstoff J zeigt gegenüber CY5 eine deutlich geringere Aggregatbildung. Quadratsäurefarbstoffe wie Sq-1 bis Sq-3 haben
15 keine stabile eigenschaften hinsichtlich der Aggregatsbildung. diese nimmt mit steigender Salzkonzentration zu.

Die erfindungsgemäßen Farbstoffe F und J zeigen dagegen stabile Eigenschaften.

20 Lichtstabilität

Die Lichtstabilität wurde bestimmt, indem Farbstofflösungen dem Tageslicht ausgesetzt wurden. die Absorption der Lösungen variierte zwischen 1,4 und 1,6 O.D. Die Abnahme der Absorption im Laufe der Zeit ist ein Maß für die Lichtstabilität der
25 Farbstoffe. Es wurden diese Bedingungen gewählt, weil auch das Handling der Farbstoffe manuelle Arbeitsschritte beinhaltet, die die Farbstoffe dem Tageslicht aussetzen. Bei CY5 ist deutlich erkennbar, dass sich bereits nach 30 min. Die Ab-

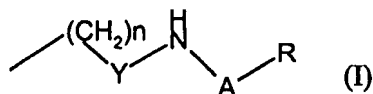
sorption um 12 % gefallen ist. Dies ist bei den erfindungsgemäßen Farbstoffen nicht der Fall, so dass diese auch benutzerfreundlicher sind, durch Erhalt einer stabilen Absorption.



Patentansprüche

1. Polymethinfarbstoffe enthaltend mindestens einen Substituenten der Formel
(I)

5



worin

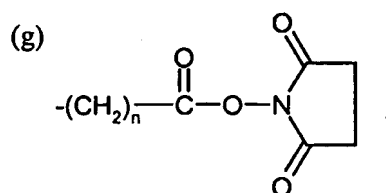
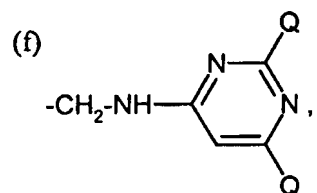
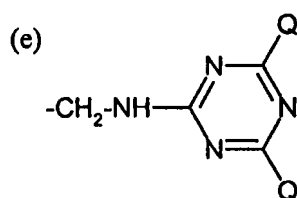
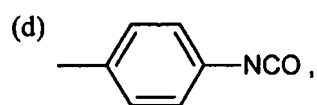
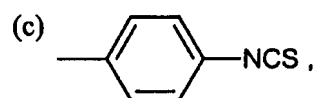
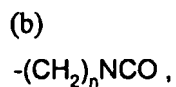
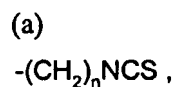
10 n für 1,2, 3, 4,5,6,7,8 oder 9 bedeuten

Y , A für elektronenziehende Reste, vorzugsweise $\text{C}=\text{O}$ oder $-\text{SO}_2-$, und

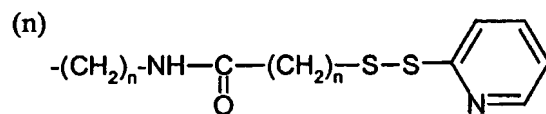
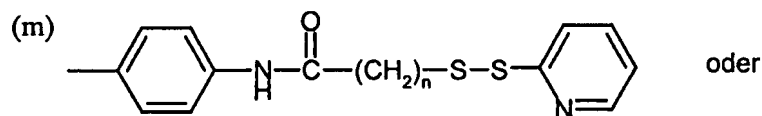
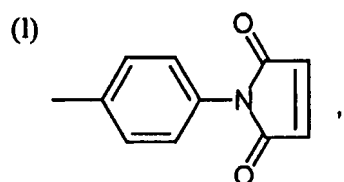
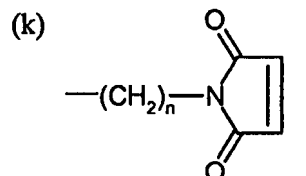
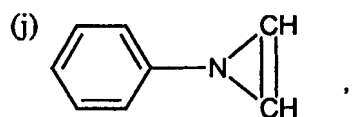
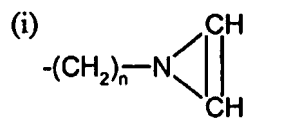
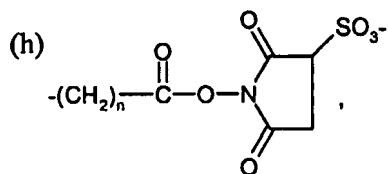
R für einen gegebenenfalls substituierten Alkyl- oder Arylrest stehen

15

und mindestens einen Substituenten ausgewählt aus der Gruppe, die gebildet wird durch

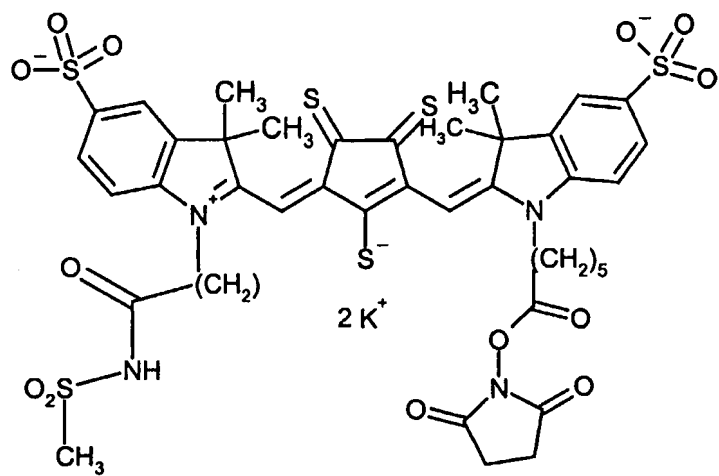
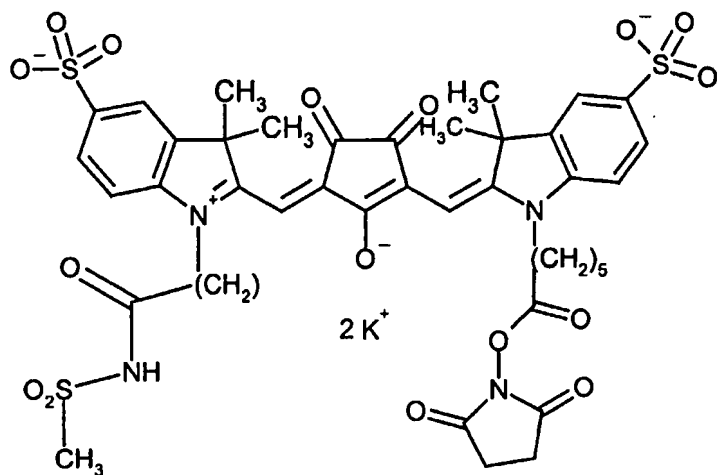


- 93 -

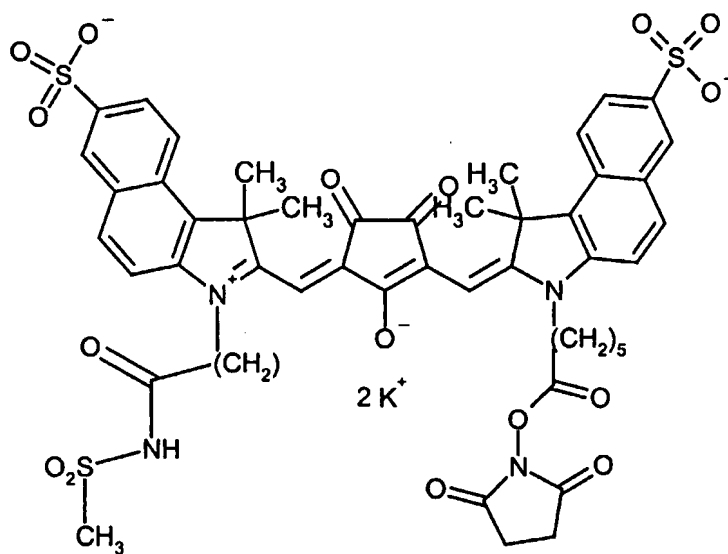
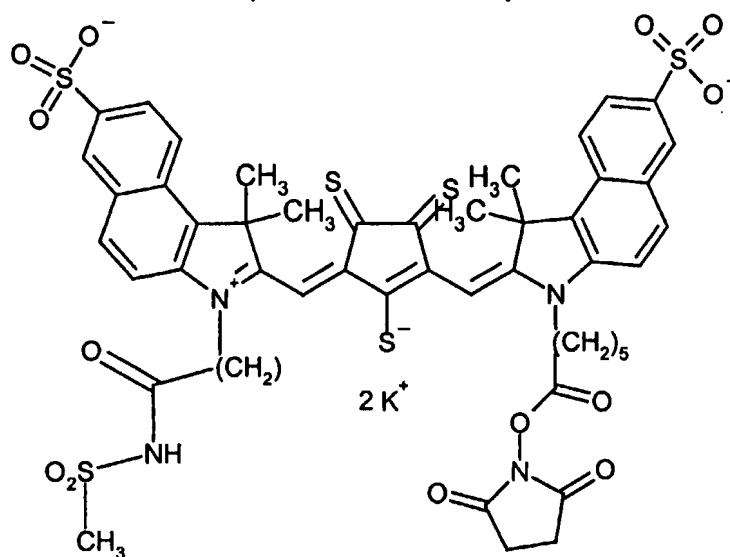


2. Verbindungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Polymethinfarbstoff um einen Cyaninfarbstoff, Merocyanin, Rhodacyanin, Styrolfarbstoff, Quadratsäurefarbstoff und/oder Crotonsäurefarbstoff handelt.
3. Verwendung von mindestens einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 oder 2 zum Markieren von Biomolekülen durch kovalente Bindung.
4. Verwendung von mindestens einem Polymethinfarbstoff enthaltend eine Gruppierung der Formel (I) zum Anfärben von Biomolekülen.

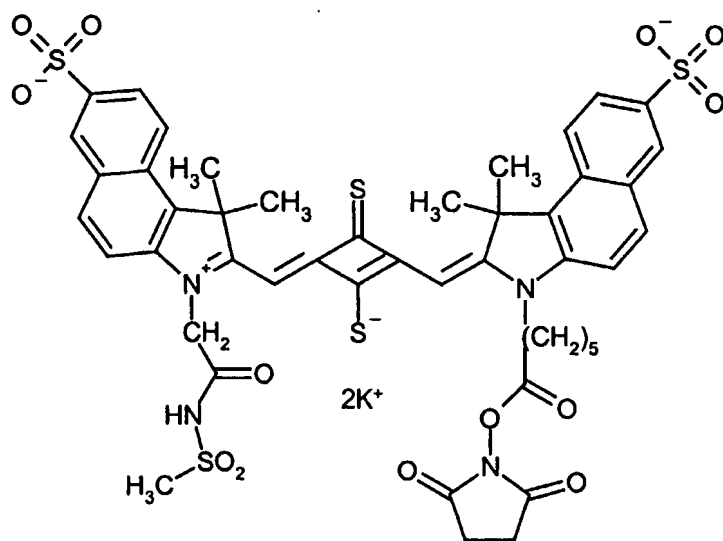
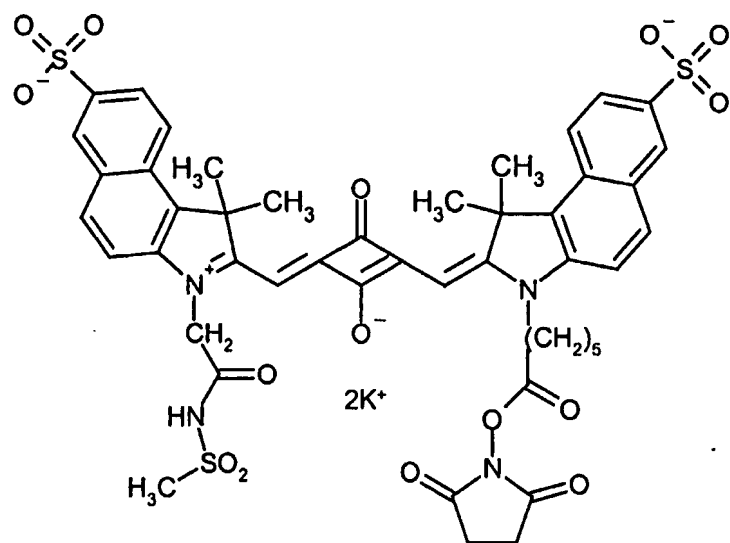
5. Verwendung von mindestens einer der folgenden Verbindungen



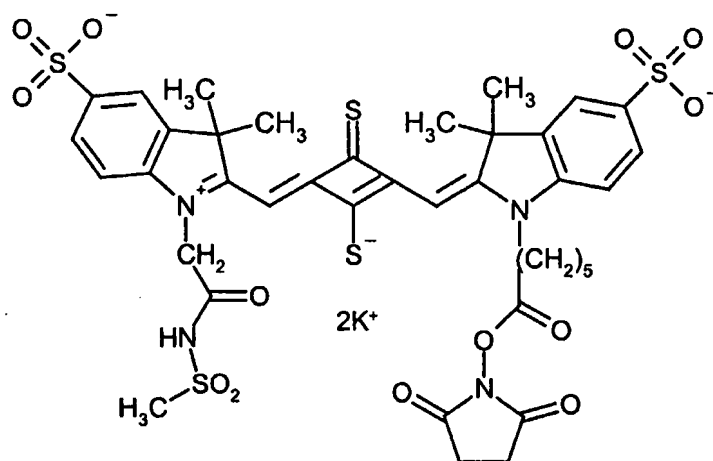
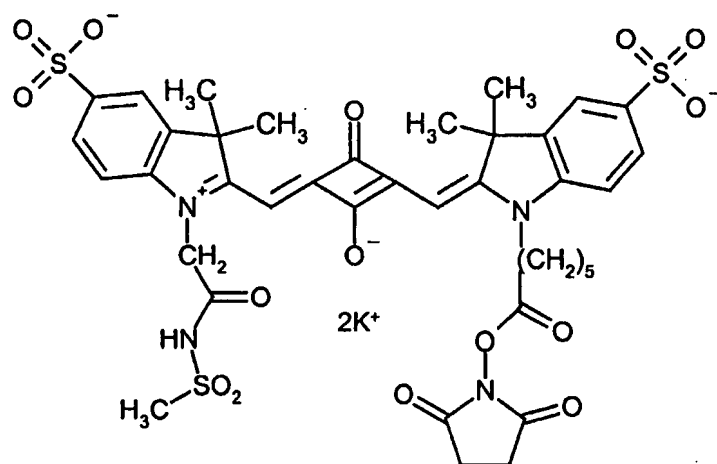
Naphthole Croconium Dyes

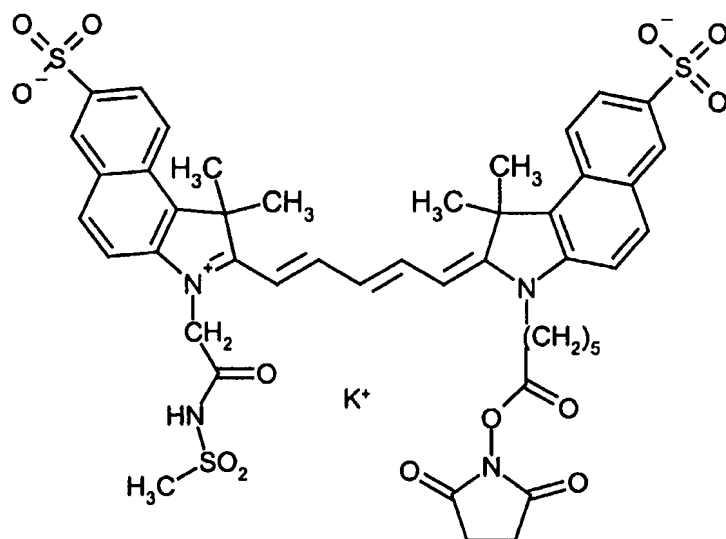
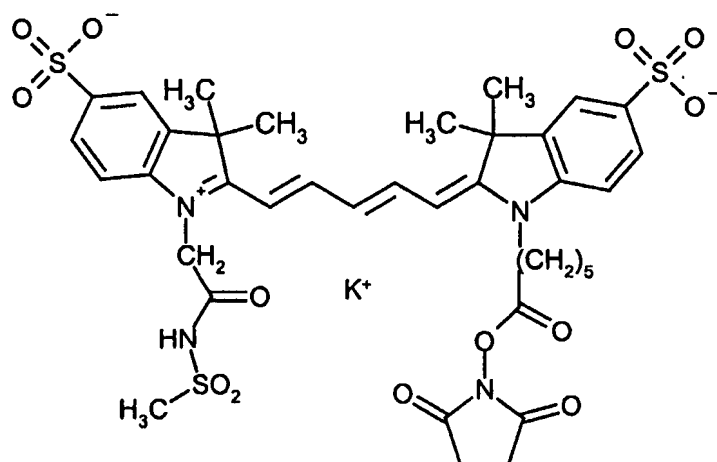


Naphthole Squaraines



- 97 -





zum Markieren von Biomolekülen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter Application No

PCT/EP 00/07070

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/58 G01N33/533 C09B23/14 C09B23/01

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N C09B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 31181 A (MUJUMDAR RATNAKAR B ;WAGGONER ALAN S (US); UNIV CARNEGIE MELLON (U) 24 June 1999 (1999-06-24) page 7, line 25 -page 11, line 11; examples	1-5
A	DE 39 12 046 A (UNIV CARNEGIE MELLON) 15 March 1990 (1990-03-15) page 9, line 22 -page 12, line 58; claim 1 & US 5 268 486 A 7 December 1993 (1993-12-07) cited in the application	1-3
A	WO 97 13810 A (SORIN BIOMEDICA CARDIO SPA ;DELLA CIANA LEOPOLDO (IT); GRIGNANI AN) 17 April 1997 (1997-04-17) cited in the application claim 12	1-3
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

8 document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 January 2001

Date of mailing of the international search report

24-01-2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ketterer, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter I Application No
PCT/EP 00/07070

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 10 81 311 B (GEVAERT PHOTO-PRODUCTEN N. V.) 5 May 1960 (1960-05-05) cited in the application the whole document ---	1,2
A	EP 0 779 540 A (AGFA GEVAERT NV) 18 June 1997 (1997-06-18) Formel (I) und alle weitere Formeln ---	1,2
A	EP 0 638 841 A (FUJI PHOTO FILM CO LTD) 15 February 1995 (1995-02-15) page 12 -page 17 ---	1,2
A	US 5 294 709 A (UKAI TOSHINAO ET AL) 15 March 1994 (1994-03-15) Formeln: D-2, D-3, D-25, D-26, D-43, S-2, S-3, S-17, S-19, S-24, S-25 -----	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP00/07070

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: **1-4 (partially), 5 (completely)**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See supplemental sheet ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of box I.2

Claims Nos.: 1-4 (partially), 5 (completely)

The present patent claims relate to a disproportionately large number of possible compounds.

They relate to such a large number of polymethine dyes and their corresponding substituents (substituents of formula (I) as well as formulae (a) to (n)) that they appear not to be sufficiently clear (and/or to be worded in too broad terms) according to the terms of Article 6 PCT to such an extent that a meaningful search is impossible.

For this reason, the search was restricted to parts of the claims that seemed to be supported and disclosed according to the above mentioned terms, i.e. those parts that relate to European Patent Classification classes

C09B23/00D

C09B23/00R

C09B23/00S

C09B23/00B

C09B23/14

G01N33/58D (application classes)

G01N33/533 (application classes)

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). EPO policy, when acting as an International Preliminary Examining Authority, is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case, irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report (Article 19 PCT) or during any Chapter II procedure whereby the applicant provides new claims.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/07070

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9931181 A	24-06-1999	AU 1828899 A EP 1042407 A	05-07-1999 11-10-2000
DE 3912046 A	15-03-1990	JP 2191674 A JP 2757965 B JP 10096727 A JP 2898264 B JP 10088012 A US 5486616 A US 5569766 A US 5569587 A US 5268486 A	27-07-1990 25-05-1998 14-04-1998 31-05-1999 07-04-1998 23-01-1996 29-10-1996 29-10-1996 07-12-1993
WO 9713810 A	17-04-1997	IT MI952049 A AU 706668 B AU 7288296 A CA 2234450 A EP 0876428 A US 6136612 A	09-04-1997 17-06-1999 30-04-1997 17-04-1997 11-11-1998 24-10-2000
DE 1081311 B		BE 569130 A FR 1223289 A GB 904332 A US 3282933 A	01-11-1966
EP 0779540 A	18-06-1997	JP 9179236 A US 5936086 A US 5741632 A	11-07-1997 10-08-1999 21-04-1998
EP 0638841 A	15-02-1995	DE 69424006 D DE 69424006 T JP 7056265 A US 5464734 A	25-05-2000 14-09-2000 03-03-1995 07-11-1995
US 5294709 A	15-03-1994	JP 2225476 A JP 2588773 B JP 2227466 A JP 2529884 B	07-09-1990 12-03-1997 10-09-1990 04-09-1996

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. des Aktenzeichens

PCT/EP 00/07070

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N33/58 G01N33/533 C09B23/14 C09B23/01

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N C09B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 99 31181 A (MUJUMDAR RATNAKAR B ;WAGGONER ALAN S (US); UNIV CARNEGIE MELLON (U) 24. Juni 1999 (1999-06-24) Seite 7, Zeile 25 -Seite 11, Zeile 11; Beispiele ----	1-5
A	DE 39 12 046 A (UNIV CARNEGIE MELLON) 15. März 1990 (1990-03-15) Seite 9, Zeile 22 -Seite 12, Zeile 58; Anspruch 1 & US 5 268 486 A 7. Dezember 1993 (1993-12-07) in der Anmeldung erwähnt ----- -/-	1-3

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

3. Januar 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

24-01-2001

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Ketterer, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter es Aktenzeichen

PCT/EP 00/07070

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 97 13810 A (SORIN BIOMEDICA CARDIO SPA ;DELLA CIANA LEOPOLDO (IT); GRIGNANI AN) 17. April 1997 (1997-04-17) in der Anmeldung erwähnt Anspruch 12 ---	1-3
A	DE 10 81 311 B (GEVAERT PHOTO-PRODUCTEN N. V.) 5. Mai 1960 (1960-05-05) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1,2
A	EP 0 779 540 A (AGFA GEVAERT NV) 18. Juni 1997 (1997-06-18) Formel (I) und alle weitere Formeln ---	1,2
A	EP 0 638 841 A (FUJI PHOTO FILM CO LTD) 15. Februar 1995 (1995-02-15) Seite 12 -Seite 17 ---	1,2
A	US 5 294 709 A (UKAI TOSHINAO ET AL) 15. März 1994 (1994-03-15) Formeln: D-2, D-3, D-25, D-26, D-43, S-2, S-3, S-17, S-19, S-24, S-25 -----	1,2

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In ☐ationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/07070

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr. 1-4 (teilweise), 5 (vollständig)
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 1-4 (teilweise), 5 (vollständig)

Alle geltenden Patentansprüche beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Verbindungen.

In der Tat umfassen sie so viele Polymethinfarbstoffe mit entsprechender Substituierung (Substituenten der Formel (I) einerseits sowie der Formeln (a) bis (n) andererseits), daß sie im Sinne von Art. 6 PCT in einem solchen Maße unklar (und/oder zu weitläufig gefasst) erscheinen, daß eine sinnvolle Recherche undurchführbar ist.

Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als gestützt und offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend, die die Europäischen Patentklassen

C09B23/00D

C09B23/00R

C09B23/00S

C09B23/00B

C09B23/14

G01N33/58D (Applikationsklassen)

G01N33/533 (Applikationsklassen)

umfassen.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung die zur selben Patentfamilie gehören

Inten 99 Aktenzeichen

PCT/EP 00/07070

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9931181 A	24-06-1999	AU 1828899 A EP 1042407 A	05-07-1999 11-10-2000
DE 3912046 A	15-03-1990	JP 2191674 A JP 2757965 B JP 10096727 A JP 2898264 B JP 10088012 A US 5486616 A US 5569766 A US 5569587 A US 5268486 A	27-07-1990 25-05-1998 14-04-1998 31-05-1999 07-04-1998 23-01-1996 29-10-1996 29-10-1996 07-12-1993
WO 9713810 A	17-04-1997	IT MI952049 A AU 706668 B AU 7288296 A CA 2234450 A EP 0876428 A US 6136612 A	09-04-1997 17-06-1999 30-04-1997 17-04-1997 11-11-1998 24-10-2000
DE 1081311 B		BE 569130 A FR 1223289 A GB 904332 A US 3282933 A	01-11-1966
EP 0779540 A	18-06-1997	JP 9179236 A US 5936086 A US 5741632 A	11-07-1997 10-08-1999 21-04-1998
EP 0638841 A	15-02-1995	DE 69424006 D DE 69424006 T JP 7056265 A US 5464734 A	25-05-2000 14-09-2000 03-03-1995 07-11-1995
US 5294709 A	15-03-1994	JP 2225476 A JP 2588773 B JP 2227466 A JP 2529884 B	07-09-1990 12-03-1997 10-09-1990 04-09-1996